Franz A. Bieber

MOLEKULARE ASPEKTE ZUR ATMUNG DER SÄUGER:

Untersuchungen an adulten (Bisam, Ondatra zibetica) und embryonalen Hämoglobinen (Hausschwein, Sus scrofa domestica embryonalis)

1983

MOLEKULARE ASPEKTE ZUR ATMUNG DER SÄUGER:

Untersuchungen an adulten (Bisam, Ondatra zibetica) und embryonalen Hämoglobinen (Hausschwein, Sus scrofa domestica embryonalis)

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Franz A. Bieber
aus Goldbach
1983

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juni 1983

Dekan:	Prof.Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof.Dr. H. Probst
2. Berichterstatter:	Prof.Dr. G. Braunitzer

UNIV. LEIDEN BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

M e i n e n E l t e r n

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof.Dr. G. Braunitzer am Max Planck Institut für Biochemie von Dezember 1980 bis Ende 1982 durchgeführt. Meinem Doktorvater, Herrn Prof.Dr. H. Probst, möchte ich für die Förderung, der Max Planck Gesellschaft für die finaziellen Mittel und Herrn Prof.Dr. G. Braunitzer für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, sowie für Planung und Diskussion der Arbeit danken.

Allen Mitgliedern der Abteilung für Proteinchemie möchte ich danken, insbesondere Frau Marquarding für eifrige Beschaffung der Schweineembryonen Herrn A. Stangl für die Arbeit am Analysator und nicht zuletzt Frl. B. Schrank und Herrn C. Krombach für die ausgezeichneten Arbeiten am Sequenator.

Ich versichere, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe.

F.A. Bieber

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543907_0040

Abkurzungsverzeichnis:

$TosPheCH_2Cl$ = Chlor-(N-tosyl-L-phenylalanin)methan; Quadrol = N,N,N',N'Tetrakis(2-hydroxypropyl)ethylendiamin; Reagenz I = (Isothiocyanato)benzol-4-sulfonsäure, Natriumsalz; Reagenz IV = 7-(Isothiocyanato)naphthalin-1,3,5,-trisulfonsaure, Tri-natriumsalz.

DC = TLC = Dünnschicht, HAc = Essigsäure, Ac = Acylrest, CCl_4 = Tetrachlorkohlenstoff, Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan, TFA = Triflouressigsäure, Tp = tryptisches Peptid, PTH = Phenylthiohydantoin, PAGE = Polyacrylamid-Gelelektrophorese, HPLC = Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie, RP = Umkehrphase, 2,3-DPG = 2,3-Bisphosphoglycerat, KS = Kopf-Steiß-Länge, HbE = embryonales Hamoglobin, HbA = adultes Hämoglobin, MCH = mittlerer zellularer Hb Gehalt, MCV = mittleres zelluläres Volumen, ma = 1 x 10^6 Jahre, mb = Millibar, $P_{50}O_2$ = Sauerstoffpartialdruck bei 50% Sättigung,

D = Asp = Asparaginsäure	C = Cys = Cystein
N = Asn = Asparagin	V = Val = Valin
B = Asp oder Asn	M = Met = Methionin
T = Thr = Threonin	L = Leu = Leucin
S = Ser = Serin	Y = Tyr = Tyrosin
E = Glu = Glutaminsäure	F = Phe = Phenylalanin
Q = Gln = Glutamin	W = Trp = Tryptophan
Z = Glu oder Gln	K = Lys = Lysin
G = Gly = Glycin	H = His = Histidin
A = Ala = Alanin	R = Arg = Argingin

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I. E I N L E I T U N G 1

II. M E T H O D E N 5

1. GEWINNUNG DES BLUTES, HAMOLYSE, TITER, KOMPONENTENTRENNUNG, HAMABSPALTUNG 5

1.1 BISAM 5

1.1.1 Gewinnung des Blutes 5
1.1.2 Hämolyse 5
1.1.3 Titerbestimmung 5
1.1.4 Hamabspaltung nach Rossi & Fanelli 6

1.2 EMBRYOS 6

1.2.1 Isolierung der Erythrozyten 6
1.2.2 Trennung der Komponenten 7
1.2.3 Hämabspaltung nach Teale 8

2. KETTENTRENNUNGEN 9

2.1 BISAM 9

2.2 EMBRYOS 10

3. ELEKTROPHORESEN 11

3.1 Gelelektrophoresen 11

3.1.1 PAGE unter nativen Bedingungen 11
3.1.2 PAGE mit Harnstoff und Triton X-100 11

3.2 Dünnschicht-Elektrophorese (DC-Elektrophorese) 12

3.3 Hochspannungs Papier-Elektrophorese 13

4. ENZYMATISCHE SPALTUNG DER KETTEN DURCH TRYPSIN UND DIE ASP-PRO-SPALTUNG 13

4.1 BISAM 13

4.1.1 Enzymatische Spaltung und Gelfiltration 13
4.1.2 Hydrolytische Spaltung der Asp-Pro-Bindung 14

4.2 EMBRYO 15

4.2.1 Tryptische Spaltung der Ketten 15

5. ISOLIERUNG DER PEPTIDE 16

5.1 BISAM 16

5.1.1 Ionenaustauscher DOWEX 50Wx4 16
5.1.2 Hochspannungs-Elektrophorese 16
5.1.3 Hochdruck-Flüssigkeit-Chromatographie (HPLC) 16

5.2 EMBRYO 17

5.2.1 Lösliche Peptide 17
5.2.2 "core"-Peptide 18

6. ANALYSEN 18

7. SEQUENZANALYSE 19

III. E R G E B N I S S E 21

DAS BISAMHAMOGLOBIN 21

8. GEWINNUNG UND AUFARBEITUNG DES BISAMBLUTES 21

9. KETTENTRENNUNG 22

10. TRYPTISCHE SPALTUNG 24

10.1 Peptide der α-Ketten 25

10.1.1 Die lösliche Fraktion 25
10.1.2 Die "core" Fraktion 30

10.2 Peptide der β-Ketten 30

11. SEQUENZANALYSE 34

DIE EMBRYONALEN HAMOGLOBINE VOM SCHWEIM 39

12. DAS ZYTOLOGISCHE BILD 39

13. TRENNUNG DER KOMPONENTEN UND DEREN ONTOGENESE 41

14. KETTENTRENNUNG 46

15. STRATEGIE DER SEQUENZANALYSE 48

16. DIE TRYPTISCHE SPALTUNG DER KETTEN UND GELFILTRATION AN SEPHADEX G25 49

17. ISOLIERUNG DER PEPTIDE 51

18. SEQUENZANALYSE 62

IV. D I S K U S S I O N 67

19. DIE EVOLUTIONAREN UND ATMUNGSPHYSIOLOGISCHEN ASPEKTE AUS DEN SEQUENZDATEN DES BISAMHÄMOGLOBINS 67

19.1 Die Stellung des Bisams innerhalb der Nagetiere 67

19.2 Die Atmungsphysiologie aus molekularer Sicht 72

20. DIE EMBRYONALEN HÄMOGLOBINE BEIM SCHWEIN 74

20.1 Die Sauerstoffversorgung im Uterus 74

20.2 Die Expression der Hämoglobine 75

20.2.1 Die O_2-Affinitäten des embryonalen Blutes 77

20.2.2 Die intrinsischen Affinitäten der embryonalen Komponenten 78

20.2.3 Die Wechselwirkung mit Poly-Phosphaten, CO_2 und Protonen 81

20.3 Die Atmung des Embryos 84

20.4 Phylogenetische Aspekte der embryonalen Hämoglobine 85

20.4.1 Die Evolution aus funktioneller Sicht 85

20.4.2 Entstehung der embryonalen Globin Ketten 87

V. Z U S A M M E N F A S S U N G 95

VI. L I T E R A T U R 99

I. E I N L E I T U N G

Das Makromolekul HÄMOGLOBIN ist eines der bestuntersuchten Biomoleküle überhaupt. Sein Studium hat der Biochemie zahllose methodische Fortschritte gebracht und wesentlich zum Verständnis der Proteinstruktur, sowie enzymatischer Prozesse beigetragen. Auch die Evolutionsforschung und die Genetik der Eukaryonten haben nicht zuletzt wertvolle Anstöße durch die Analyse des Blutfarbstoffes erfahren.

Meine Arbeit versucht dieser Tradition zu folgen. Durch die Aufklärung der Sequenz des Bisamhämoglobins wurde das methodische Rüstzeug zur Analyse der embryonalen Hämoglobine geschaffen. Letztere wiederum leisten einen Beitrag zu Fragen der Genexpression, steuern mit ihren Sequenzdaten zum Verständnis der Sauerstoffversorgung im embryonalen Säugerorganismus bei und liefern einige interessante Aspekte zur alten Haeckel'schen biogenetischen Regel (69).

Diese Arbeit gliedert sich in zwei Teile.

Der erste Teil stellt den Einstieg in die Sequenzierung von Proteinen im Rahmen paläontologischer und atmungsphysiologischer Aspekte dar.

Der zweite Teil ist der Hauptteil: Er befaßt sich mit der Isolierung aller embryonalen Hämoglobin-Komponenten vom Schwein, der präparativen Trennung der Ketten und der Erarbeitung der Primärstruktur aller embryonalen β-Typ-Ketten. Die Sequenz soll die Basis zum Verständnis der embryonalen Atmung bilden und den molekularen Ansatzpunkt im Vergleich mit anderen embryonalen Globinketten.

Zum ersten Teil.

Die Aufklärung der Primärstruktur von Proteinen liefert wertvolle Informationen über die stammesgeschichtliche Entwicklung der Arten (Paläontologie der Proteine). Dabei spielt das Hämoglobin besonders im Bereich von 100 Millionen Jahren, also innerhalb der Säugetierklasse, eine wichtige Rolle. Mit seinen 2 x 287 Aminosäuren (α + β-Ketten) kann es theoretisch ebensoviele Informationen über den Verwandtschaftsgrad verschiedener Spezies geben. Sind sich jedoch zwei Hämoglobine weniger als 65% ähnlich (homolog), ist die Wahrscheinlichkeit der Rückmutation schon so groß, daß eine Aussage nicht mehr signifikant ist. Das Hämoglobin nun hat eine "Evolutionsgeschwindigkeit", die sich in 100 Millionen Jahren eben in ca. 30-40% Unterschied beider Proteinketten (ca. 100 Austausche) widerspiegelt.

Die Wahl fiel auf den Bisam aus zwei Gründen:

1.) Der Bisam gehört zur Familie der Wühler (Cricetidae), deren gemeinsamer Vorfahre vor ca. 40ma lebte (58). Die Verwandtschaftsverhaltnisse innerhalb dieser Familie sind nicht klar, so daß die Sequenzanalyse des Hämoglobins dazu wertvolle Informationen liefert.

2.) Der Bisam ist sehr gut an das Leben im Wasser angepaßt: Er kann bis zu 10min tauchen. Wir erhofften in der Sequenz Anhaltspunkte für eine veränderte Sauerstoffaffinität zu finden.

Zum Hauptteil.

Die Mammalia synthetisieren im Laufe ihrer Ontogenese verschiedene Hämoglobine, die sich in ihren chemischen und

physiologischen Eigenschaften voneinander unterscheiden. Beim Menschen werden sieben Proteinketten exprimiert, die sieben Hamoglobine bilden: zwei embryonale (Hb GowerI u. Hb GowerII), drei fetale (HbF_A, HbF_G u. Hb Portland) und zwei adulte Hamoglobin-Spezies (HbA_1 u. HbA_2). Die Strukturgene liegen fur die α-Typ-Ketten auf Chromosom 16, für die β-Typ-Ketten auf Chromosom 11 (55,56). Hier stellen sich zwei Fragen: "Warum ist dieses Genom dermaßen komplex, und weshalb benötigt insbesondere der intrauterine Organismus so verschiedene Hamoglobinkomponenten". Für die fetale Phase sind die molekularen Verhältnisse der Atmung verstanden, wie aber die Sauerstoffversorgung im embryonalen Organismus erfolgt, ist bisher nicht geklärt. Ein embryonaler Blutfarbstoff des Menschen wurde zuerst von Künzer 1954 (18) postuliert. Er unterscheidet sich distinkt von dem Fetalen. Der elektrophoretische Nachweis der ε- und ζ-Ketten und der daraus gebildeten Hb-Komponenten GowerI und GowerII gelang Huehns et al. 1961 (19), Hb Portland wurde 1967 von Jones beschrieben (21). Die Primärstruktur der ε-Ketten wurde 1979 von Clegg et. al. (23) zum Teil aufgeklärt und durch die DNA-Sequenz von Proudfood 1980 vervollständigt (22). Die Sequenz der ζ-Ketten wurde 1981 von Aschauer (24,25) in unserer Gruppe erarbeitet. Inzwischen sind die Primärstrukturen embryonaler Hämoglobine mehrerer Spezies (Mensch, Maus, Huhn und zum Teil Kaninchen (59)) bekannt. Die Informationen, welche die Sequenzdaten liefern, haben noch nicht zu einer Klärung der embryonalen Sauerstoffversorgung geführt. Brauchbare physiologische Daten sind bisher nur vom

Kaninchen (49) bekannt. Die Untersuchungen beim Menschen sind erschwert, da die Beschaffung von genügend embryonalem Blut an ethischen Schranken scheitert.

Die Arbeiten mit Embryonen vom Schwein wurden begonnen, weil hier die Verhältnisse etwas einfacher sind. Kleihauer zeigte 1972, daß beim Schwein kein foetaler Blutfarbstoff gebildet wird (45). Während der Ontogenese schaltet der Organismus direkt von den embryonalen zu den adulten Hämoglobinen um. Die höhere Affinität des Blutes zum Sauerstoff wird in der postembryonalen Phase durch eine verminderte Synthese an 2,3-DPG erreicht. Die Konzentration dieses Effektors betragt nur ein fünftel (DPG<Hb) der des adulten Organismus: Die Atmung ist daher allosterisch reguliert (30,48) Erst nach der Geburt wird durch die Ankurbelung des Rapoport-Luebering-Zyklus die adulte 2,3-DPG Konzentration von 10mM (DPG>Hb) erreicht (28,29). Steer konnte 1980 (46) die embryonalen Blutfarbstoffe des Schweines zum Teil an DEAE-Sephacel trennen. Dabei wurde eine neue Kette vom β-Typ beschrieben, die auf ein bisher unbekanntes embryonales Globin-Gen schließen läßt. Diese sogenannten γ-Ketten bilden mit den ζ-Ketten die Komponente HeideI. Weil die ζ-Ketten blockiert vorliegen, war es moglich, durch direkte Sequenzierung von GowerI und HeideI die N-terminalen Bereiche der ε- und γ-Ketten über 30 Positionen zu bestimmen (46). Dies war der Stand der Forschung zu Beginn meiner Dissertation.

II. M E T H O D E N

1. GEWINNUNG DES BLUTES, HÄMOLYSE, TITER, KOMPONENTEN-TRENNUNG, HÄMABSPALTUNG

1.1 BISAM

1.1.1 Gewinnung des Blutes

Ein Tier wurde in einem Kanalsystem bei Garching nahe des Atommeilers gestöbert und mit einer Falle gefangen. Unmittelbar nach Tötung wurden durch Herzpunktion mit einer heparinisierten Spritze 10ml Blut entnommen. Die Blutzellen wurden 10min bei 5000 x g abzentrifugiert und 2 x mit 0.9% Kochsalzlösung gewaschen.

1.1.2 Hämolyse

Die Zellen (ca. 5ml) wurden mit 2 Vol. Wasser unter gelegentlichem Schütteln über 2Std. lysiert; 100µl CCl_4 dienten zur Extraktion der Lipide. Die Pelletierung der Membranen erfolgte bei 15000rpm in 40min. Der Überstand wurde über Nacht im Kühlraum gegen Wasser dialysiert.

1.1.3 Titerbestimmung

Transformationslösung: 0.16% Kaliumhexacyanoferrat
(Trafolösung) 0.16% Kaliumcyanid
in dest. Wasser

2ml Trafolösung werden mit 10µl Hämoglobinlösung versetzt, 15min bei Raumtemperatur stehen gelassen, und die Extinktion

bei 540nm gegen die Trafolösung als Leerwert gemessen. Die Konzentration des Hämoglobins errechnet sich nach dem Lambert-Beerschen Gesetz; der millimolare Extinktionskoeffizient von Hämoglobin in der CNMet-Form beträgt 44. Das Hämolysat (18ml) enthielt nach Titer 6.8% Hämoglobin = 1.22 g.

Zur Feststellung der Anzahl der Komponenten und der Ketten, wurden Aliquots des Hämolysates einer Elektrophorese unter nativen und denaturierenden Bedingungen unterworfen (siehe 3.1).

1.1.4 Hämabspaltung nach Rossi & Fanelli (4)

Die Gewinnung des Globins erfolgte nach der Aceton-HCl-Methode. Dazu wurde die Konzentration der Hämoglobinlösung mit Wasser auf 5% eingestellt und langsam unter Rühren in 20 Volumina, auf -18°C gekühltes, saures Aceton (1%HCl) getropft. Das ausgeflockte Globin wurde 40min bei 5000rpm in der Kühle abzentrifugiert, 2 x mit kaltem, sauren Aceton gewaschen, in 20ml Wasser gelöst und gegen 0.1n Essigsäure dialysiert. Die salzfreie Globinlösung wurde lyophilisiert und bis zur Kettentrennung bei -20°C aufbewahrt. Aus 10ml Blut lassen sich gut 1g Globin gewinnen.

1.2 EMBRYOS

1.2.1 Isolierung der Erythrozyten

Die Schweineembryonen wurden über längere Zeit im Schlachthof München gesammelt. Sie wurden sorgfältig aus dem

Uterus präpariert, Kopf-Steiß-Länge (KS) bestimmt und katalogisiert. Zur Gewinnung der Blutzellen wurden die Embryos fein zerschnitten, mit reichlich 0.9% Kochsalzlosung versetzt und über Zellstoffgaze abfiltriert. Die Zellen wurden bei 5000 x g abzentrifugiert, in Eppendorfgefäße überführt, noch 2 x mit 0.9% Kochsalz gewaschen und bei -70°C aufbewahrt.

Von zwei Isolierungen (2cm und 4cm KS) wurden Ausstriche angefertigt und nach Pappenheim (62) gefärbt.

1.2.2 Trennung der Komponenten

- Extraktion des Hämoglobins

Die isolierten Erythrozyten wurden mit 2 Volumina Wasser 1/2Std. unter gelegentlichem Schütteln lysiert, die unlöslichen Bestandteile sodann 5min in der Eppendorf-zentrifuge pelletiert, und der überstand abgehoben. Durch Nachextraktion der galertigen, roten DNA-Membran-Masse mit Trafolösung konnten ca. 10% Hämoglobin zusätzlich gewonnen werden. Die elektrophoretische Analyse des Hämolysates zeigt, daß mindestens vier embryonale Komponenten vorliegen. Für die Trennung der Blutfarbstoffe wurden jeweils 80-100mg Hämoglobin aus Erythrozyten von Embryonen moglichst gleicher Kopf-Steiß-Länge isoliert. Das Hämolysat wurde mit wenigen Körnchen Kaliumhexacyanoferrat oxidiert und durch Dialyse gegen den Startpuffer über Nacht mit CN^- ligandiert.

- Trennung der Komponenten an DEAE-Sephacel (3)

Säule: Ø 1.6 x 15cm = 30ml

Startpuffer: 20mM Tris/HCl pH 8.5, 2mM KCN

Gradient: 0 - 75mM NaCl im Startpuffer,
250 + 250ml, (15mM/ml) linear;

Fraktionen: 5ml/20min

Die CNMet-Hb-Lösung wurde auf die Säule gepumpt und mit 45ml Startpuffer nachgewaschen. Dann wurden die embryonalen Hämoglobine durch den Salzgradienten eluiert. Die Fraktionen wurden im Durchflußphotometer bei 280nm und bei 415nm (Shimadzu, Double-Beam Spectralphotometer UV-210A) vermessen. Die Extinktionen bei 415nm dienten zur Quantifizierung der Komponenten:
Σ415nm der Gipfelfaktionen x Fraktionsgröße [ml] x 0.34.
Diese berechneten Werte stimmten gut mit den Gewichtswerten überein. Aliquots der Gipfelfraktionen wurden auf ihre Einheitlichkeit elektrophoretisch untersucht.

1.2.3 Hämabspaltung nach Teale (5).

Die vereinten Gipfelfraktionen der DEAE-Chromatographie wurden gegen schwach essigsaueres Wasser dialysiert, mit 0.1n HCl auf pH 2.0 titriert und im Kühlraum 1:1 mit Methylethylketon versetzt. Nach kräftigem Schütteln im Scheidetrichter, und nach der Phasentrennung befand sich das Globin in der wassrigen Unterphase. Nach Dialyse gegen Wasser (Entfernung von Methylethylketon) wurde die Globinlösung am Rotationsverdampfer eingeengt, lyophilisiert, und das Globin bis zur weitern Verarbeitung im Kuhlschrank aufbewahrt.

2. KETTENTRENNUNGEN

2.1 BISAM

Die Trennung der Globin Ketten erfolgte über CM-Cellulose.

Säule: ⌀ 2.5 x 16cm = 78ml, CM 52 preswollen (Whatman)

Startpuffer: 0.05M Natriumacetat pH 5.0, 8M Harnstoff, 0.02% Mercaptoethanol

Gradient: Puffer A: Startpuffer + 0.02M NaCl

Puffer B: -"- + 0.10M NaCl

Der Gradient wurde logarithmisch gestaltet.

Fraktionen: 10ml/15min

100mg Globin wurden in 20ml Startpuffer, jedoch pH 8.5, gelöst und mit 40mg Dithioerytrit (DTE) im Stickstoffstrom 2Std. reduziert. Nach Einstellung des pH-Wertes mit 0.1n HCl auf 4.9, wurde die Lösung aufgetragen und die Säule mit 80ml Startpuffer gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte durch einen logarythmischen Kochsalzgradienten in der Weise, daß im ersten, geschlossenen Gradientengefäß 300ml Puffer A vorgelegt, und im zweiten sukzessiv Puffer B zugesetzt wurde. Das Elutionsprofil wurde im Durchflußphotometer bei 280nm aufgenommem.

Die Gipfelfraktionen wurden kurz gegen 1% Essigsäure dialysiert, am Rotationsverdampfer eingeengt und über Sephadex G25 entsalzt. Nach erneutem Einengen wurden die

Globinlösungen lyophilisiert. Die Reinheit der Ketten wurde elektrophoretisch überprüft. Die Ausbeute betrug für die α-Ketten 23mg(45%) und für die β-Ketten 30mg(53%).

2.2 EMBRYOS

Die Kettentrennungen der embryonalen Globinkomponenten bereitete Schwierigkeiten. Folgende Methode, in Anlehnung an die Arbeit von Clegg (6), brachte hinreichende Ergebnisse zur Trennung der Ketten von GowerI und HeideI.

Säule: Ø 1.6 x 4cm = 8ml, CM 52, preswollen (Whatman)

Startpuffer: 10mM Natrium-Phosphat pH 6.8, 8M Harnstoff
100mg DTE/l

Gradient: Puffer A = Startpuffer
Puffer B = -"- + 150mM Na-Phosphat

Fraktionen: 3.5ml/15min

Der Gradient wurde konvex gestaltet: In einem Gradientengefäß mit drei Zylindern (3 x 100ml) wurden die ersten beiden Gefäße je mit 100ml Puffer A, das dritte mit 100ml Puffer B gefüllt.

30 bis 40mg Globin wurden in 2ml Startpuffer, jedoch bei pH 8.5 und unter Zusatz von 15 bis 20mg DTE gelöst, mit Stickstoff begast und über Nacht bei RT stehen gelassen. Die Probe wurde 1:1 mit 8M Harnstofflösung versetzt, mit wenig verd. Phosphorsäure der pH-Wert auf 6.8 titriert und in die obere Hälfte des CM-Gels eingerührt. Nach 15 Fraktionen Startpuffer, bzw. nachdem der Startgipfel eluiert war (Detektion mit Durchflußphotometer bei 280nm), wurde der Gradient angelegt. Durch Messung der Leitfähigkeit konnte

der Gradientenverlauf kontrolliert werden. Die Gipfelfraktionen wurden vereint und wie in Abschnitt 2.1 beschrieben weiter aufgearbeitet. Die Reinheit der Ketten wurden elektrophoretisch überprüft.

Die ζ-Ketten wurden zur Sequenzanalyse Herrn Dr. H. Aschauer überlassen, die ε- und γ-Ketten bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank aufbewahrt.

3. ELEKTROPHORESEN

3.1 Gelelektrophoresen

Für die Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE) wurden Rundgele (Ø 0.5 x 7cm) verwendet.

3.1.1 PAGE unter nativen Bedingungen

Diese Elektrophorese wurde in Anlehnung an die Veröffentlichung von Davis (1) durchgeführt.

Gelzusammensetzung: 10% Acrylamid-Bisacrylamid,
0.4M Tris-HCl-Puffer pH 8.7;

Elektrophoresepuffer: 0.07M Tris-Glycin pH 8.3.

Die Proben wurden ad 50% Sucrose beschwert, 0.01% Bromphenolblau diente als Farbstoffmarker. Die Laufzeit betrug 2Std. mit 4.5mA pro Röhrchen und bei Raumtemperatur (RT).

3.1.2 PAGE mit Harnstoff und Triton X-100

Dieses Gel nach Alter (2) ist wie folgt zusammengesetzt:

Gelzusammensetzung: 12% Acrylamid-Bisacrylamid,
8M Harnstoff,
1,5% Triton X-100, 5% Essigsäure;

Elektrophoresepuffer: 5% Essigsäure;

Probenpuffer: 6M Harnstoff, 8% Essigsaure,
8% ß-Mercaptoethanol.

Die Laufzeit betrug 5Std. bei RT und 140Volt nach 1Std. Vorelektrophorese bei 200Volt. Pro Gel wurden 20-40µg Protein in 20µl Probenpuffer aufgetragen. Die Färbung und Fixierung der Proteine mit 1% Amidoschwarz in 7% Essigsaure dauerte 5min, die Entfärbung in 7% Essigsäure ca. 24Std.
Es ist anzumerken, daß bisweilen eine heterogene Bande mehr Ketten vortäuscht als die spätere Analyse zeigt, wie z.B. bei den β-Ketten des Bisams und den embryonalen ζ-Ketten des Schweines.

3.2 Dünnschicht-Elektrophorese (DC-Elektrophorese)

Die Reinheitsüberprüfung und Mengenabschätzung der Peptide nach den einzelnen Reinigungsschritten erfolgte mit der DC-Elektrophorese. Als Trägermaterial dienten TCL-Cellulose-Platten 0.1mm (Merck, Darmstadt). Es wurden 0.5-5nM Peptid, entsprechend 1-4µl wassriger Lösung getupfelt. Als Referenz diente ein Gemisch aus den Aminosauren Glu, Asp, Val, Arg, His und Lys. Nachdem die Proben trocken waren (Fohn), wurde die Platte gleichmäßig mit Elektrophresepuffer bespruht und sofort in die Apparatur (horizontale, geschlossene, Kammer) uberfuhrt.
Elektrophoresepuffer: 5% Pyridin, 5% Aceton, ca. 2.2%

Essigsaure ad pH 5.4. Die Elektrophorese dauert 1.5Std. bei 450Volt und 12-15mA. Das Elektrophoresebett wurde mit Wasser gekühlt (12°C). Die Peptide wurden nach Trocknung der Platte mit Ninhydrin sichtbar gemacht. Zur Erkennung der Tyrosin- und Histidin-haltigen Peptide wurde die Platte außerdem mit diazotierter Sulfanilsäure besprüht.

Kleine Peptide, bis zu 5 Aminosäuren, die in der HPLC (siehe Abschnitt 6) mit der Front erschienen, wurden in praparativem Maßstab (bis 50nM) mit der DC-Elektrophorese gewonnen.

3.3 Hochspannungs Papier-Elektrophorese

Zur Nachreinigung von Peptiden war in einzelnen Fallen (α-Ketten beim Bisam) die Hochspannungs-Elektrophorese an Papier, Whatman Nr.1 nötig. Die Peptide wurden mit 2n Essigsäure aus dem Papier eluiert und mehrmals am Rotationsverdampfer eingeengt.

4. ENZYMATISCHE SPALTUNG DER KETTEN DURCH TRYPSIN UND DIE ASP-PRO-SPALTUNG

4.1 BISAM

4.1.1 Enzymatische Spaltung und Gelfiltration

Die lyophilisierten Ketten (130mg α-Ketten, 55mg β-Ketten) wurden ad 2% (w/v) in 0.05n NaOH gelöst und der

pH-Wert auf 11 eingestellt. Der Ansatz wurde mit 2% (w/w) TosPheCH_2Cl-Trypsin in zwei Portionen, insgesamt 4Std. bei RT gespalten. Der pH-Wert wurde nach einer halben Stunde, vor Zugabe der 2. Portion Trypsin auf 10.5 erhöht und dann sich selbst überlassen. Die "core"-Peptide wurden bei pH 6.6 ausgefällt. Sie wurden durch Zentrifugation (15000 x g) abgetrennt und 2 mal mit wenig Wasser gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden weiter auf pH 2.8 titriert. Die Peptide dieser löslichen Fraktion wurden über Sephadex G25 in 0.1n Essigsäure vorgetrennt, das Eluat bei 230nm und 280nm vermessen. Die Gipfelfraktionen wurden eingeengt (1µM Protein/ml) und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren.

Der "core" Niederschlag der α-Ketten wurde nach Oxidation mit Perameisensäure, wie oben beschrieben, tryptisch nachgespalten und wie die lösliche Fraktion chromatographiert.

4.1.2 Hydrolytische Spaltung der Asp-Pro-Bindung

Zur Asp-Pro-Spaltung wurden 40mg β-Ketten ad 1% (w/v) in 70% Ameisensäure, 6M Guanidin-HCl drei Tage bei 42°C inkubiert (7). Der Ansatz wurde 1:1 mit 8M Harnstofflösung verdünnt, über Sephadex G25 entsalzt, eingeengt und lyophilisiert. Die Reinigung des Asp-Pro-Peptides erfolgte analog zur Kettentrennung des Globins über CM-Cellulose (Abschnitt 2.1). Eluiert wurde mit einem linearen Salzgradienten von 20 bis 100mM NaCl.

4.2 EMBRYO

4.2.1 Tryptische Spaltung der Ketten

Die Isolierung der Peptide verlief bei den embryonalen β-Typ Ketten analog. Die im folgenden beschriebenen Bedingungen gelten für die ε-Ketten, davon abweichende methodische Varianten werden in Klammern zugefügt.

10 bis 16mg Lyophilisat, entsprechend 0.7 - 1.0μM Protein, wurden enzymatisch gespalten. Es wurde in 1 - 1.5ml 0.02n NaOH gelöst, und der pH-Wert mit 0.1n HCl auf 10.5 eingestellt. Die Spaltung erfolgte bei RT. Sie wurde durch Zugabe von 1% (w/w) TosPheCH_2Cl-Trypsin gestartet und die Effektivität der Spaltung durch Kontrolle des pH-Wertes verfolgt. Nach 30min wurde der pH-Wert mit 0.02n NaOH wieder auf 10 titriert und erneut 1% Trypsin dazu gegeben. Die Ketten wurden noch zwei Stunden weiterverdaut, dann der pH-Wert gesenkt, wobei das "core" bei pH 6.2 ausfiel. Es wurde abzentrifugiert, 2 x mit wenig H_2O gewaschen und gleich weiter aufgearbeitet (Abschnitt 5.2.2). Der lösliche Anteil wurde mit dem "core" Waschwasser vereint und der pH-Wert mit 0.1n HCl auf 2.5 gesenkt. Dieses Peptidgemisch (1.5 - 2ml) wurde über Sephadex G25 vorfraktioniert.

Säule: ⌀ 1.6 x 180cm = 360ml, (⌀ 1.6 x 95cm = 190ml)
Sephadex G25f (G25sf) in 0.1n Essigsäure

Fraktionen: 2.5 - 3,5ml/30min (2ml/30min)

Das Eluat wurden bei 280nm und 230nm gegen 0.1n Essigsäure vermessen und in 3 bis 4 Fraktionen aufgeteilt. Diese, im

folgenden als SI, SII, SIII, SIV bezeichneten Fraktionen, wurden auf 0.3 bis 0.7ml (ca. 1µM Peptid/ml) am Rotationsverdampfer eingeengt. Alle Fraktionen und der Gesamtansatz wurden halbquantitativ mit der DC-Elektrophorese analysiert und dann bis zur weitern Untersuchung im Kühlschrank aufbewahrt.

5. ISOLIERUNG DER PEPTIDE

5.1 BISAM

5.1.1 Ionenaustauscher DOWEX 50Wx4

5.1.2 Hochspannungs-Elektrophorese

5.1.3 Hochdruck-Flüssigkeit-Chromatographie (HPLC)

zu 5.1.1: Die Peptide der Sephadexfraktionen wurden über DOWEX gereinigt (8). Säule: ∅ 0.6 x 55cm, 45°C, 4.3ml/15min

Pufferschema:

		pH	mS
0.1M Pyridin	50% HAc	2.25	1.5
0.2M "	40% "	2.85	3.0
0.6M "	30% "	3.55	8.0
2.0M "	1% "	6.30	10.0

Gradientenschema:

130ml		
130ml + 100ml		
	100ml + 100ml	
		100ml
260ml	200ml	200ml

Das Eluat wurde mit der automatisierten Ninhydrin Reaktion

(Technikon Autoanalyzer) vermessen. Protein-haltige Fraktionen wurden eingeengt und zur Entfernung des Pyridinacetats 2 mal mit Wasser gewaschen. Die Reinheit der Peptide wurde mit der DC-Elektrophorese überprüft und Aliquots für die Analyse hydrolysiert.

zu 5.1.2: Peptide, die sich nicht nach 5.1.1 reinigen ließen, wurden über die Hochspannungs-Elektrophorese (3.2 u. 3.3) getrennt.

zu 5.1.3: Bei Peptiden, die sich nicht nach 5.1.1 und 5.1.2 isolieren ließen, gelang die Reinigung über die HPLC (5.2.1)

5.2 EMBRYO

Die Trennung der Peptide der embryonalen Globine erfolgte über Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) an der Umkehrphase (9).

5.2.1 Lösliche Peptide

Die Peptide der Fraktionen SI - SIV wurden ausschließlich über die HPLC gereinigt. Dazu stand ein Gerät der Firma Beckman zur Verfügung (Gradient Liquid Chromatograph Modell 334, Controller 421). Bei den ε-Ketten wurde RP8, bei den α^A-Ketten RP2 als Säulenmaterial verwendet.

Säule: Edelstahl, ø 46 x 250mm,
RP2 bzw. RP8 LiChrosorb, 7µm; Merck

Puffer A: 50mM Ammoniumacetat pH 6.0

Puffer B: 100% Acetonitril

Gradient: 1%B/min mit 1ml/min Flussrate

Pro Lauf wurden 30 - 100nM Peptid in 30 - 100µl wässriger

Lösung appliziert. Die Detektion erfolgte bei 230nm im Durchflußphotometer (Biotronik BT 3030) und wurde mit einem Schreiber (Shimadzu C-R1A) aufgezeichnet. Die Fraktionierung erfolgte von Hand. Die Gipfel wurden im Stickstoffstrom getrocknet, zur Entfernung des Ammoniumacetats mit wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Zur Reinheitsüberprufung und halbquantitativen Mengenabschätzung wurden die Peptide in 30 - 100µl Wasser gelöst und davon 1µl mit der DC-Elektrophrese untersucht. Aliquots peptidhaltiger Fraktionen wurden zur Analyse hydrolysiert.

5.2.2 "core"-Peptide

Das "core" wurde in 0.1% TFA ad 100nM Peptid/100µl gelöst und im TFA System getrennt:

Säule: Edelstahl ∅ 46 x 250mm, RP2 LiChrosorb

Puffer A: 0.1% TFA,

Puffer B: 100% Acetonitril

Gradient: 2%B/min mit Flussrate 1ml/min

6. ANALYSEN

5 bis 20µM Peptide wurden in 6n HCl bei 110°C im Vakuum für 20Std. hydrolysiert. Die Methionin- und Cystein-haltigen Peptide wurden vor der Hydrolyse mit Perameisensäure oxidiert. Die unter diesen Verhältnissen bedingte Zerstörung von Thryptophan wurde durch Zusatz von Thioglykolsäure verzogert. Die Hydrolysate wurden getrocknet (Vakuumzentrifuge) und im Gerät der Fa. Beckman (Modell 121C) analysiert (18).

7. SEQUENZANALYSE

Die Peptide wurden nach Edman-Begg (11) automatisch über die Filmtechnik im Sequenator (890B, 890C und 890CII der Fa. Beckman) abgebaut.

Methode A: Die Polypeptidketten, sowie einige mit dem Reagenz IV (14) modifizierten Lysyl-Peptide, wurden nach dem "Quadrol"-Programm (1M Quadrol als Kupplungspuffer) analysiert (15).

Methode B: Die Arginyl-Peptide, das C-terminale Pro-Peptid, sowie kleinere hydrophile Lysyl-Peptide (Tp7 Bisam) und solche mit dem Reagenz I modifizierte (12), nach dem "Propin"-Programm: 1.25M Diethylaminopropin, pH 9.0.

Die Konversion erfolgte bei Methode A automatisch im Autokonverter, (Sequemat P-6, Fa. Kontron Technik GmbH): 60°C, 3M TFA; bei Methode B in 14min bei 80°C mit 3M TFA. Zur Identifizierung der PTH-Aminosäuren aus Sequenzerläufen mit mehr als 50nM kürzerer Peptide wurde Dünnschicht-chromatographie (27) in drei aufeinanderfolgenden Systemen verwendet. Es wurden ca. 10nM PTH in 1-5µl Essigester getüpfelt.

Platten: DC-Fertigplatten, Kieselgel 60 F254, 0.25mm Merck

System I: Propionsäure-tert-Butylester

System II: 80% Ethylenchlorid, 20% Eisessig,

System III: 10% Essigester, 50% Methanol, 2% Eisessig
38% Ethylenchlorid

In einzelnen Fällen, z.B. bei Ser, His und Cys, sowie bei längeren Peptiden unter 50nM erfolgte die PTH-Identifizierung über Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (13). Es wurden ca. 1-3nM appliziert.

Säule: RP18, ODS-Hypersil, Shandon

Puffer A: 10mM Ammoniumacetat pH 4.8

Puffer B: Acetonitril

Eluiert wurde mit einem Stufengradienten von 5 - 70% B in 20min bei 60°C. Die Detektion erfolgte in der Weise, daß multichromatisches Licht erst nach dem Passieren der Küvette bei 254nm gegen 330nm gemessen wurde. Die Serine und Threonine erscheinen dabei als negative Gipfel. Als Gerät stand die Anlage der Firma Hewlett Packard (1084 B Liquid Chromatograph) zur Verfügung.

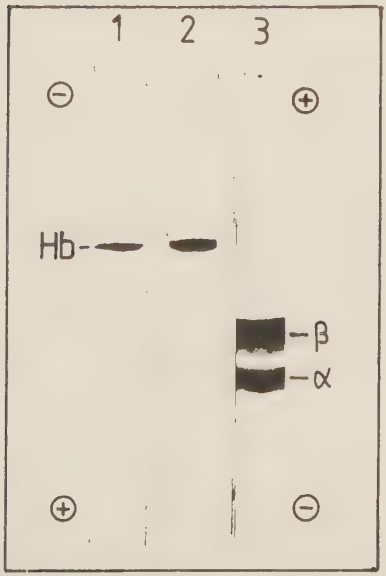
III. E R G E B N I S S E

DAS BISAM HÄMOGLOBIN

8. GEWINNUNG UND AUFARBEITUNG DES BISAMBLUTES

Das Blut stammt von einem mit der Falle gefangenen Tier. Die Entnahme erfolgte wie in Abschnitt 1.1.1 der Methoden beschrieben. Von Ratten und Mäusen ist bekannt (31,32), daß ihr roter Blutfarbstoff aus mehreren Komponenten besteht. Die Elektrophoresen des Hämolysates zeigen folgendes Bild: Unter nativen Bedingungen ist eine Hämoglobin-Bande zu sehen, die auch bei größerer Auftragsmenge einheitlich bleibt (Bild 1,links). Die Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen ergibt keine einheitlichen Banden für die β-Ketten (Bild 1, rechts).

Bild 1



Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bahn 1+2, native Bedingungen, 10%iges Gel
Auftragsmenge:
Bahn 1 = 20µg Hb
Bahn 2 = 50µg Hb
Die Bande ist einheitlich

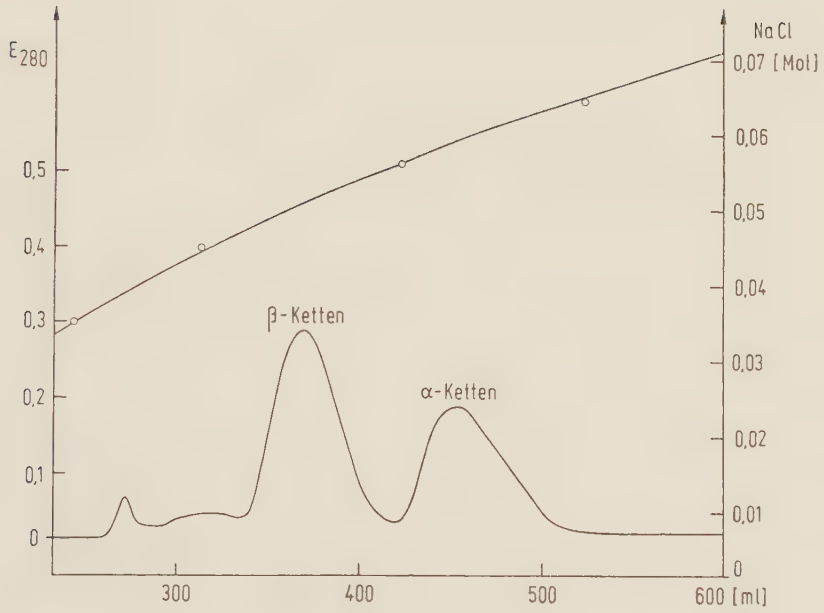
Bahn 3, denaturierende Bedingungen 12%iges Gel.
Auftragsmenge: 80µg Hb
Die Bande der α-Ketten ist einheitlich, die der β-Ketten spaltet auf.

Die Aufspaltung der Bande für die β-Ketten deutet auf mehrere Komponenten hin. Da eine Trennung an DEAE-Sephacel nicht gelang, wurde die elektrophoretische Uneinheitlichkeit der β-Ketten als Artefakt gedeutet: Der adulte Bisam hat nur eine Hämoglobinkomponente (32).
Zur Abspaltung der Häm Gruppe wurde die Methode nach Rossi & Fanelli (4) gewählt. Diese Technik ist geeignet für ca. 3-7%ige Hämoglobinlösungen, und sie ergibt ein besonders hämfreies, weißes Globin. Die Ausbeute lag bei 80 - 85%.

9. KETTENTRENNUNG

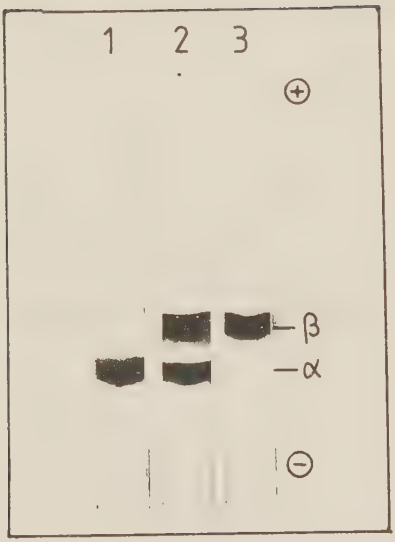
Die Trennung der α- und β-Ketten ist in Diagramm 1 wiedergegeben. Die β-Ketten werden vor den α-Ketten eluiert. Bei pH 5,0 haben letztere 11, die β-Ketten 9 positive Ladungen. Der Gipfel der β-Ketten ist symmetrisch, ein Indiz für deren Einheitlichkeit. In der denaturierenden Elektrophorese ergeben die α-Ketten eine Bande, die β-Ketten zeigen wieder ihre schon beobachtete Aufspaltung (Bild 2). Es wurden insgesamt 3 Kettentrennungen durchgefuhrt (100mg und 2 x 300mg); die Ausbeuten lagen bei den α-Ketten zwischen 47 und 67%, bei den β-Ketten zwischen 59 und 77%. Der in Abschnitt 2.1 beschriebene logarithmische Gradient erwies sich als optimal. Bei einem linearen Gradienten von 20 - 100mM NaCl "tailten" die Proteine stark (ohne Abbildung).

Diagramm 1



Kettentrennung des Bisamglobins über CM-Cellulose,
Säule: ⌀ 1.6 x 12cm,
Puffer: 50mM Ammonium-Acetat pH 5.0, 8M Harnstoff, 0.02% β-Mercaptoäthanol
Gradient: 20-100mM NaCl, (logarithmisch), 10ml/15min
Probe: 100mg Globin in 20ml Startpuffer

Bild 2



Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen, 12%iges Gel pH2.5

von links nach rechts:

Bahn 1 α-Ketten 40µg

Bahn 2 Hämoglobin 80µg

Bahn 3 β-Ketten 30µg

Die Bande der α-Ketten ist einheitlich, die Bande der β-Ketten spaltet auf.

10. TRYPTISCHE SPALTUNG

Von den α-Ketten wurden 8µM, von den β-Ketten 3µM wie beschrieben (4.1.1) gespalten. Es wurde Trypsin verwendet, dessen chymotryptische Aktivität durch TosPheCH_2Cl verhindert ist. Die Spaltung wurde bei pH 10 durchgefuhrt, weil nur in diesem pH-Bereich die Ketten löslich sind. Nach vier Stunden Inkubation bei RT konnte keine weitere Abnahme des pH-Wertes mehr bemerkt werden, und der Verdau wurde beendet. Beim Ansauern auf pH 6.5 fielen Proteine aus. Sie werden im folgenden als "core" bezeichnet. Es handelt sich um den hydrophoben Bereich der G-Helix, sowie um Aggregate. Außerdem konnen große Peptide mit ausfallen, wodurch sich ihre Ausbeuten in der loslichen Fraktion verringern. Der

Überstand wurde weiter auf pH 2.5 titriert und über Sephadex G25m in 0.1n Essigsäure chromatographiert.

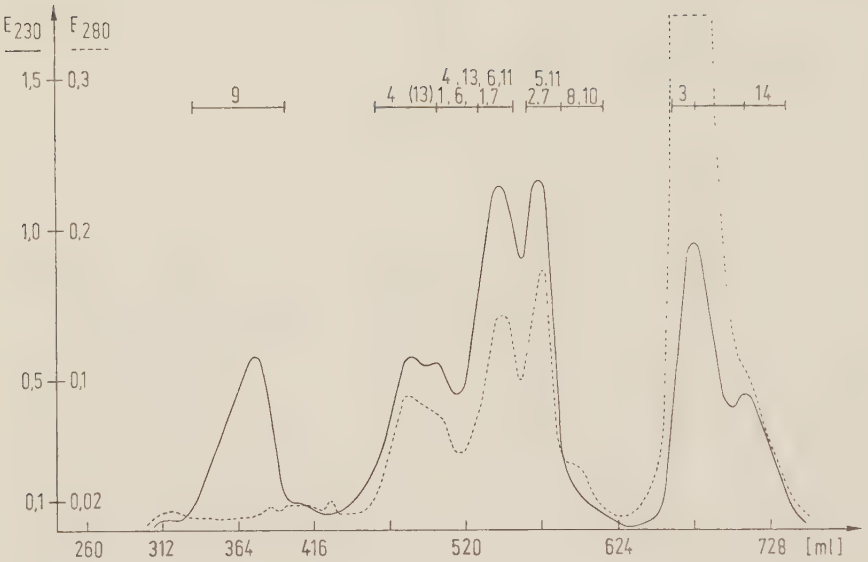
10.1 Peptide der α-Ketten

10.1.1 Die lösliche Fraktion

a) Sephadex G25m

Die Gelfiltration der löslichen Fraktion über Sephadex G25m ist in Diagramm 2 wiedergegeben. Das Chromatogramm zeigt im wesentlichen drei Gipfel; es wurde in acht Fraktionen geschnitten, sie wurden mit SI - SVIII bezeichnet und zur Vororientierung mit Hilfe der DC-Elektrophorese untersucht. Der erste Gipfel SI enthält das Peptid Tp9. (Diese tryptischen Peptide werden im folgenden mit Tp bezeichnet, ihre Nummer gibt die Reihenfolge beginnend vom N-Terminus der Ketten wieder. Als Bezug dient die Nomenklatur der menschlichen Globine (17)). Tp9 wurde ohne weitere Reinigung sequenziert. Im letzten Gipfel (SVII + SVIII) befinden sich die Peptide Tp3 und Tp14, ersteres enthält ein Trp, so daß das Verhältnis 280/230nm >>1 wird. Sie haben in der DC-Elektrophorese die gleiche Beweglichkeit, lassen sich aber nach dem Tyr/His-Test differenzieren. Im mittleren Gipfel SII - SVI sind die restlichen löslichen Peptide enthalten.

Diagramm 2



Gelfiltration über Sephadex G25m, Säule: ⌀ 2.5 x 143cm, 0.1M Essigsäure 5.2ml/20min. Die Zahlen über den Gipfeln geben die darin gefundenen Peptide an.

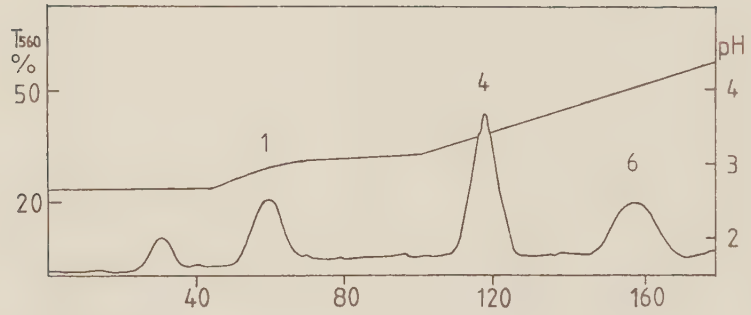
DC-Elektrophorese

Ninhydrin positiv,
zusatzlich Tyr,His positiv

b) Ionenaustauscher

Die Isolierung der α-Ketten-Peptide erfolgte konservativ über den Ionenaustauscher Dowex 50Wx4 (5.1.1). Die Reinheit der Peptide wurde vor der Analyse mit der DC-Elektrophorese (5.1.3) geprüft. Die Kurven sind in Diagramm 3 und 4 wiedergegeben, die Elektrophoresen der Gipfelfraktionen darunter. Aus dem Dowex-Lauf von SII + SIII konnten Tp1, Tp4 und Tp6; aus SIV + SV die Peptide Tp2, Tp5 und Tp7 isoliert werden. Die Fraktion SVI des zweiten Gipfels aus der Sephadex Chromatographie enthielt Tp8 und Tp10. Beide Peptide wurden mit der präparativen Hochspannungs-Elektrophorese an Papier gewonnen (3.3). Tp11 und Tp5 wurden über Dowex zusammen eluiert und ebenfalls an Papier getrennt.

Diagramm 3



Trennung von SII und SIII an Dowex 50Wx4: Die Gipfel wurden von D1 - D4 durchnummeriert, die Identifizierung der Peptide erfolgte durch Analyse.

DC-Elektrophorese an Cellulose

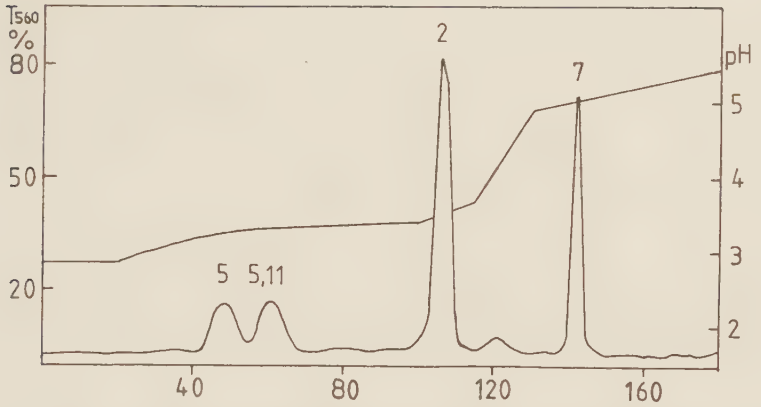
D1 = ?

D2 = Tp1

D3 = Tp4

D4 = Tp6

Diagramm 4



Trennung von SIV und SV an Dowex 50Wx4: Die Gipfel wurden von D1 - D4 durchnummeriert, die Identifizierung der Peptide erfolgte durch Analyse.

DC-Elektrophorese an Cellulose

D1 = Tp5

D2 = Tp5,11

D3 = Tp2

D4 = Tp7

10.1.2 Die "core" Fraktion

Die "core"-Fraktion wurde mit Perameisensäure oxidiert, mit Trypsin nachverdaut, und wie die lösliche Fraktion, über Sephadex G25 chromatographiert. Aus diesem Ansatz wurden Tp12 und Tp13 gewonnen (ohne Abbildung).

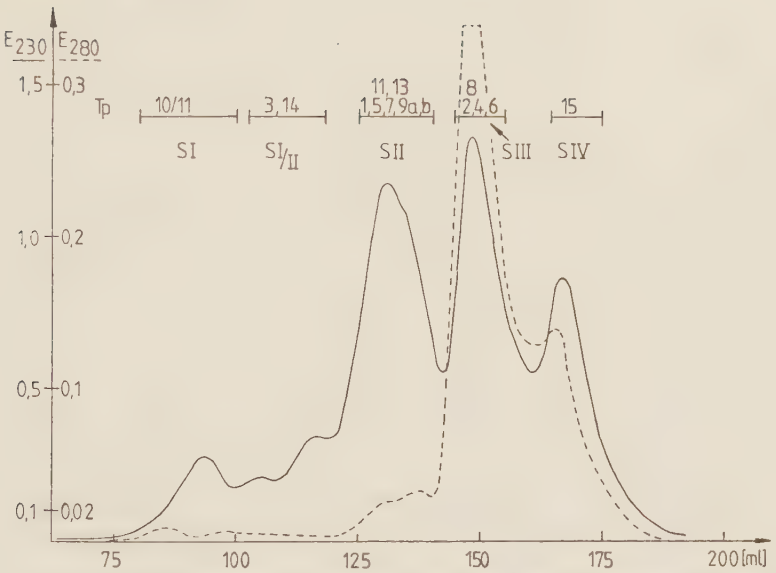
Alle tryptischen Peptide der α-Ketten konnten isoliert und sequenziert werden.

10.2 Peptide der β-Ketten

a) Sephadex G25sf

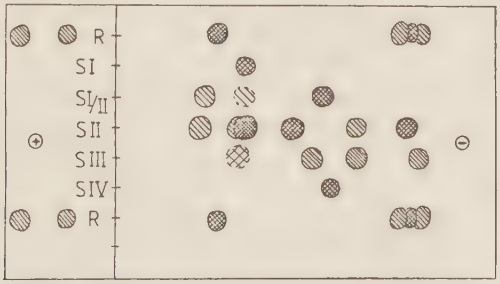
Das Elutionsprofil der löslichen Fraktion nach Vorfraktionierung über Sephadex G25sf ist in Diagramm 5 wiedergegeben. Das Chromatogramm hat im wesentlichen drei Gipfel; es wurde in fünf Fraktionen SI - SIV geschnitten, die in der DC-Elektrophorese halbquantitativ untersucht wurden.

Diagramm 5



Gelfiltration der β-Ketten-Peptide über Sephadex G25sf
Säule: Ø 1.6 x 95cm, 0.1M Essigsäure, 2.5ml/30min.
Die Zahlen über den Gipfeln geben die darin gefundenen Peptide wieder

DC-Elektrophorese



Tp10/11

Tp3,14

Tp1,5,7,9a,
9b,11,13
Tp8,2,4,6

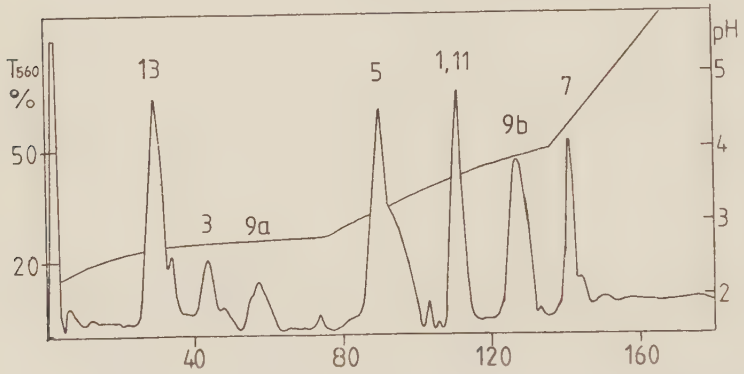
Tp15

Der erste Gipfel SI enthält das ditryptische Peptid Tp10+11; die Sequenz wurde mit 18 Abbauschritten bis über die Asp-Pro-Bindung hinaus bestimmt.

b) Ionenaustauscher

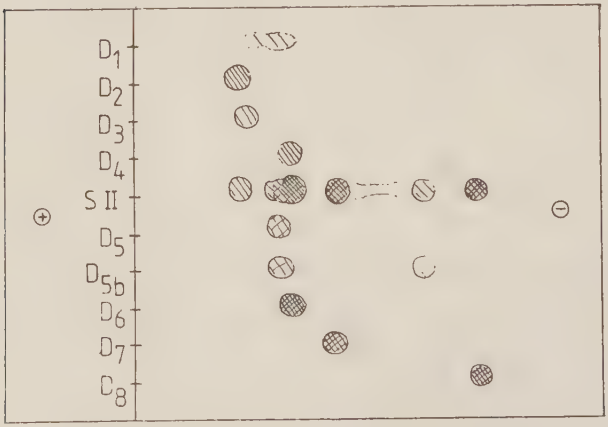
Die Fraktion SII ergab in der DC-Elektrophorese 6 Flecken; die Peptide wurden an Dowex aufgetrennt (Diagramm 6).

Diagramm 6



Trennung von SII an Dowex 50Wx4: Die Zahlen über den Gipfel bezeichen die darin gefundenen Peptide, sie wurden durch die Analyse identifiziert.

DC-Elektrophorese an Cellulose



D1 = ?
D2 = Tp13
D3 = Tp3
D4 = Tp9a
D5 = Tp5
D6 = Tp1,11
D7 = Tp9b
D8 = Tp7

Die Analysen der Gipfel ergab 6 saubere Peptide: Tp3, 5, 7, 9a, 9b und 13.

c) Papierelektrophorese

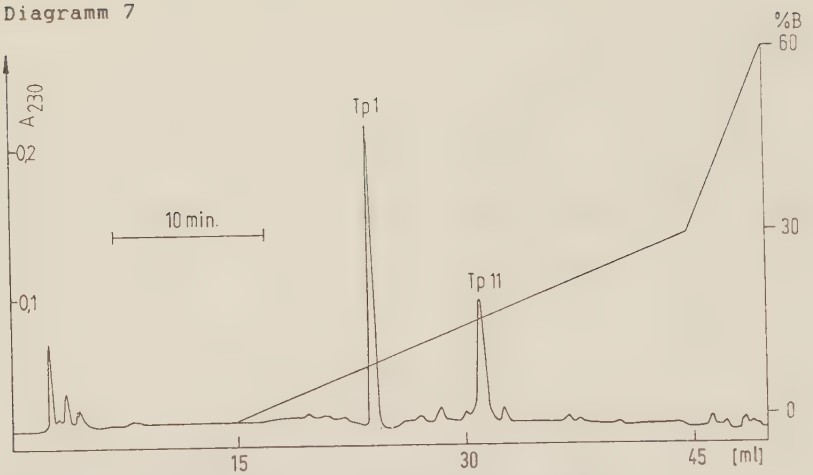
Die Fraktion SI/II wurde präparativ an Papier getrennt und daraus Tp14 und wenig Tp3 isoliert. Der letzte Sephadexgipfel enthielt Tp15.

d) HPLC

Die Sephadexfraktion SIII wurde über HPLC nach dem Kratzin'schen System (9) an RP8-Säulenmaterial chromatographiert (Abschnitt 5.2.1). Die Auftrennung war noch nicht sehr gut, dennoch ließen sich die Gipfel durch die Analyse als Tp2 und Tp4 identifizieren. Der Frontgipfel wurde elektrophoretisch weiter an Papier getrennt: Er enthielt Tp6 und Tp8.

Der Gipfel D6 vom Ionenaustauscher konnte nicht eindeutig zugeordnet werden; die DC-Elektrophorese zeigte zwar nur einen Fleck im Bereich der neutralen Peptide, die Analyse enthielt jedoch 1/2 Prolin und ließ daher auf zwei Fragmente schließen. Mit Hilfe der HPLC (5.2.1) gelang die Trennung von Tp1 und wenig Tp11 sofort (Diagramm 7).

Diagramm 7



HPLC von SIIID6, Säule: RP8 7µm, LiChrosorb;
Puffer A: 50mM Ammonium-Acetat pH 6.0
Puffer B: 100% Acetonitril, 1%/min, 1ml/min.

Das noch fehlende Tp12 konnte nicht aus der "core"-Fraktion gewonnen werden. Dieser Bereich wurde mit dem Pro-Peptid erarbeitet. Seine Isolierung gelang über CM-Cellulose im gleichen System, das zur Trennung der Ketten verwandt wurde (2.1). Die Reinheit wurde durch den Edman-Abbau von Hand geprüft. Die Ausbeute betrug nur 30%.

11. SEQUENZANALYSE

Der sequenzanalytische Abbau der Ketten, sowie der Peptide nach Edman-Begg ist in Abschnitt 6.1 der Methoden beschrieben.

Der N-terminale Bereich wurde bis zur Überlappung mit Tp5 (42 Schritte) sequenziert, und durch die Analysen der

Peptide Tp1 - Tp4 bestätigt. Die Positionen 100-122 der β-Ketten wurden durch die Sequenzierung des Pro-Peptides belegt.

Die Tabelle I faßt die Reinigung der Peptide beider Ketten zusammen.

Tabelle I

Reinigungsschema der tryptischen Peptide

Abkürzungen: S = Sephadex
D = Dowex 50Wx4
EP= Papier-Elektrophorese
E = DC-Elektrophorese
H = HPLC
c = core

1.) Bisam α-Ketten Peptide

Tp	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
S	III	V	VII	III	V	III	V	VI	I	VI	V	cII	cIII	VIII
D	2	3		3	1,2	4	4				2			
EP					2			2		1	1			

2.) Bisam β-Ketten Peptide

Tp	1	2	3	4	5	6	7	8	9a	9b	10/11	11	12	13	14	15
S	III	IV	III	IV	III	IV	III	IV	III	III	I	III	c	III	I/II	V
D	6		3		5		8		4	7		6		2		
E	1					1		2				1			2	1
H	24	44		52		4		4				31				

Die Analysen für beide Ketten sind in den Tabellen II und III aufgelistet. Die vollständige Sequenz des Bisamhämoglobins ist in Abbildung 1 wiedergegeben. Sie wird durch homologes Alignement (60) mit der Sequenz des Menschen verglichen (17).

Tabelle II

Analysen der tryptischen Peptide der Globin α-Ketten

Pos.	Tp1 1-7	Tp2 8-11	Tp3 12-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60	Tp8 61	Tp9 62-90
Asp	0.92	2.06				1.13			3.93
Thr			1.04		2.19	0.98			2.16
Ser	0.83					1.90			2.03
Glu	0.94			2.94		1.10			
Pro					0.95	0.95			1.09
Gly	1.02		0.99	2.96		2.06	1.10		2.27
Ala			0.92	3.77			0.99		5.51
Cys									
Val	1.20				1.86	2.05			2.27
Met					0.66				
Ile		0.89		1.08					
Leu	1.08			1.16					5.19
Tyr				0.96	0.95	0.94			
Phe					1.16	1.91			
Trp			(1)						
Lys	1.00	1.05	1.05		1.23	1.00	0.99	1.00	1.22
His				1.29		1.97	0.92		3.32
Arg				0.95					
Summe	7	4	5	15	9	16	4	1	29

	Tp10 91-92	Tp11 93-99	Tp12 100-127	Tp13 128-139	Tp14 140-141	Summe 1-141	Globin 1-141
Asp		2.02	3.42(3)			13	13.17
Thr			2.09	1.74		10	9.61
Ser			2.06	2.43(3)		10	9.63
Glu						5	5.28
Pro		0.98	1.95			6	5.59
Gly						10	9.93
Ala			4.36(4)	1.28		17	16.31
Cys				1.		1	1(ox)
Val		1.91	2.06	2.11		13	12.89
Met						1	1(ox)
Ile			1.02			3	2.89
Leu	0.98		4.51(6)	2.24		17	16.24
Tyr					0.99	4	3.73
Phe		1.10	1.03	1.06		6	5.95
Trp						1	1.*
Lys		0.98	1.08	1.13		11	10.77
His			2.64			10	9.60
Arg	1.02				1.01	3	3.19
Summe	2	7	28	12	2	141	141

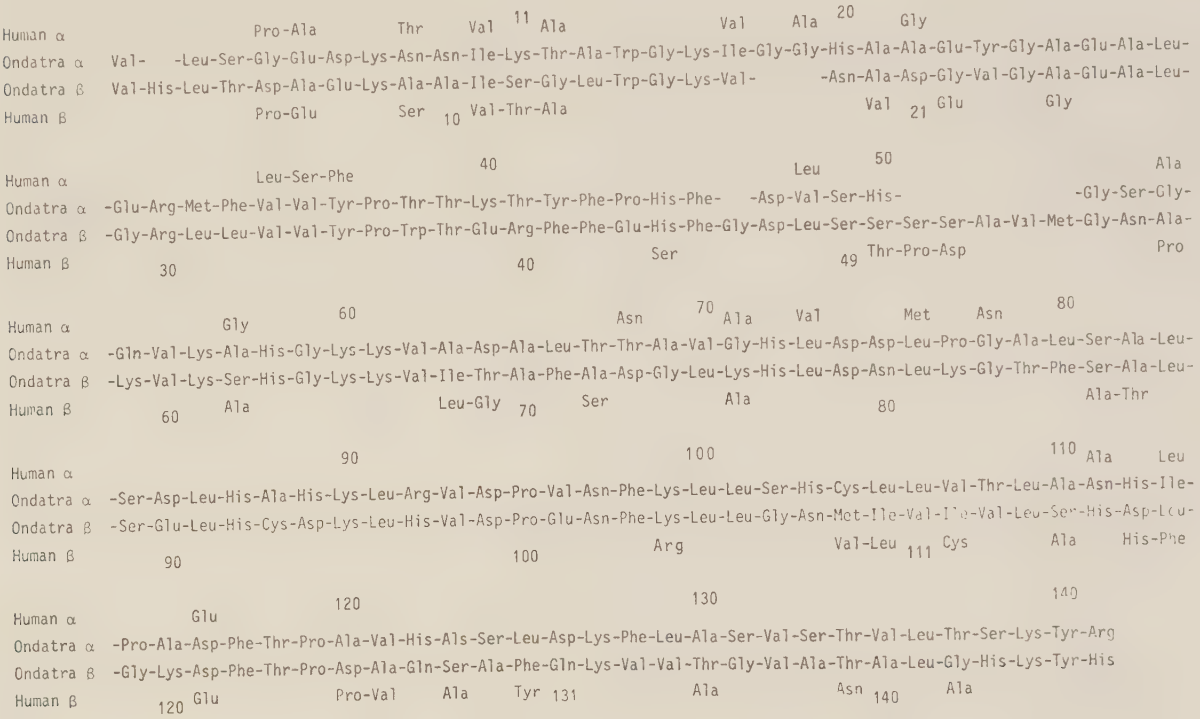
Tabelle III

Analysen der tryptischen Peptide des Pro-Peptides und des Globins der β-Ketten. Pro-P = Prolin Peptid

Pos.	Tp1 1-8	Tp2 9-17	Tp3 18-30	Tp4 31-40	Tp5 41-59	Tp6 60-61	Tp7 62-65	Tp8 66	Tp9a 67-76
Asp	1.10	-	1.87	-	2.30	-	-	-	1.19
Thr	1.03	-	-	1.08	-	-	-	-	1.16
Ser	-	1.34	-	-	3.79	-	0.86	-	-
Glu	1.07	-	1.01	1.06	1.14	-	-	-	-
Pro	-	-	-	1.05	-	-	-	-	-
Gly	-	1.62(2)	2.70	-	2.11	-	1.13	-	1.01
Ala	1.07	1.98	2.67(3)	-	2.25	-	-	-	1.95
Cys	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Val	0.89	-	1.72	1.55(2)	1.11	0.99	-	-	0.77
Met	-	-	-	-	0.78	-	-	-	-
Ile	-	0.96	-	-	-	-	-	-	0.72
Leu	1.04	1.06	-	2.31	1.20	-	-	-	1.14
Tyr	-	-	-	0.87	-	-	-	-	-
Phe	-	-	-	-	2.68(3)	-	-	-	1.04
Trp	-	(1)	-	(1)	-	-	-	-	-
Lys	0.92	1.02	-	-	1.14	1.01	0.99	1.00	1.02
His	0.89	-	-	-	0.93	-	1.02	-	-
Arg	-	-	1.20	1.08	-	-	-	-	-
Summe	8	9	13	10	19	2	4	1	10

Pos.	Tp9b 77-82	Tp10/11 83-104	Tp11 96-104	Tp13 121-132	Tp14 133-144	Tp15 145-146	Summe 1-146	Globin 1-146	Pro-P 100-146
Asp	1.92	3.35	2.08	2.18	-	-	15	16.85(15)	5.06
Thr	-	1.23	-	0.92	1.89	-	7	7.02	3.56(3)
Ser	-	2.25	-	1.12	-	-	10	8.54(10)	2.31
Glu	-	1.76	1.11	1.97	-	-	8	8.79(8)	3.35
Pro	-	0.63	1.04	0.84	-	-	3	3.51(3)	2.36
Gly	-	1.91(1)	-	-	2.16	-	14	13.89	4.05
Ala	-	1.86(1)	-	1.89	2.15	-	15	15.36	5.02(4)
Cys	-	1.27	-	-	-	-	1	1.05(ox)	-
Val	-	1.27	0.96	-	2.63(3)	-	14	13.39(14)	4.43(5)
Met	-	-	-	-	-	-	2	1.61(ox)	0.65(1)
Ile	-	-	-	-	-	-	4	3.79	1.26(2)
Leu	1.95	3.95(3)	1.00	-	1.06	-	17	16.31(17)	4.85
Tyr	-	-	-	-	-	0.68	2	1.97	0.98
Phe	-	1.66(2)	0.94	2.03	-	-	8	8.18	2.80
Trp	-	-	-	-	-	-	2	1.61(x)	-
Lys	1.11	1.80(2)	0.95	0.95	1.04	-	13	12.27(13)	3.64(4)
His	1.01	2.26	0.92		1.08	1.32	9	8.35(9)	2.52(3)
Arg	-	-	-	-	-	-	2	2.07	-
Summe	9	22	9	12	12	2	146	146	47

Abbildung 1



Homologer Vergleich der Hämoglobinketten von Bisam und Mensch. Nur die zur Sequenz des Bisams abweichenden Reste des Menschen sind dargestellt.

DIE EMBRYONALEN HÄMOGLOBINE VOM SCHWEIN

12. DAS ZYTOLOGISCHE BILD

Die Analyse der embryonalen roten Blutzellen in den Ausstrichen ergibt folgendes Bild: Embryonen mit einer KS (Kopf-Steiß-Länge) von <2cm und solche von 4cm Länge haben ein sehr ähnliches zytologisches Aussehen (Bild 3 und 4). Im Vergleich dazu sind in Bild 5 adulte menschliche Erythrozyten gezeigt.

Fast alle embryonalen Zellen besitzen einen Zellkern (Megaloblasten) und haben gut den doppelten Durchmesser (13-16μm) wie Erythrozyten (7μm). Das Volumen der Zellen (MCV) mit Kern ist somit ca. 15 mal größer als das reifer Erythrozyten. Der Zytoplasmaraum enthält bei ersteren also 10 mal so viel Hämoglobin (MCH), wenn man davon ausgeht, daß die Dichte des roten Blutfarbstoffes in beiden Zelltypen etwa gleich ist. Bei größeren Embryonen ist eine Verkleinerung des Zellkernes zu bemerken. Die Quantifizierung der Komponenten zeigt (siehe unten), daß ab 4cm KS mehr als 50% des Materials aus dem adulten Blutfarbstoff besteht: danach sollten kernlose Zellen in ca. 10fachem Überschuß vorliegen. Das Verhältnis ist aber eher umgekehrt. Daraus folgt entweder, daß die Umschaltung (switch) von embryonalen zum adulten Hämoglobin nicht mit dem zytologischen Bild einher geht (39,40), d.h. kernhaltige, späte Megaloblasten beinhalten auch adultes Hämoglobin, oder aber ist die Dichte des Hämoglobins in den Erythrozyten viel größer als in den

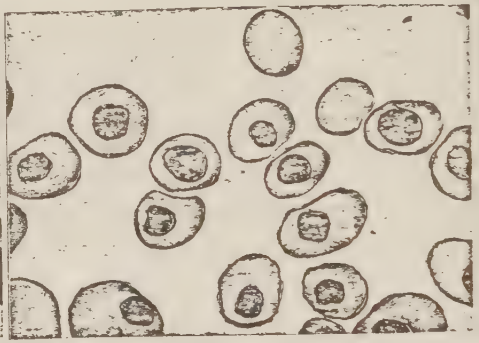
Megaloblasten. Diese Verhaltnisse sind fur die Diffusion des Sauerstoffs im Embryo von Bedeutung.

Ausstriche von embryonalen Blutzellen

Bild 3

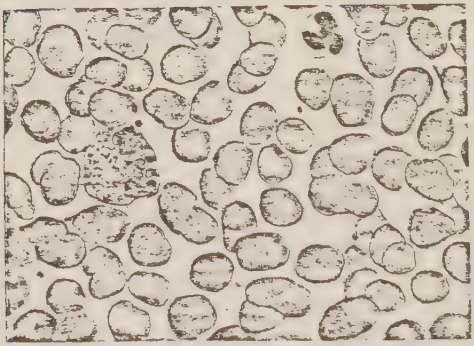
Kopf-Steiß-Lange <2cm

Bild 4



Kopf-Steiß-Lange 4cm

Bild 5



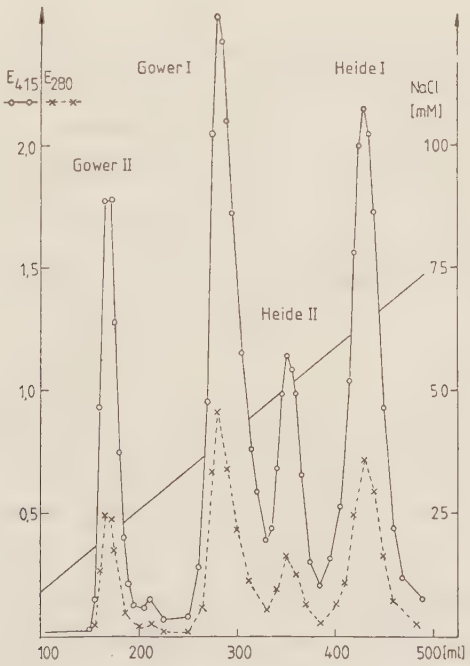
Ausstrich von adultem Blut (Mensch)

Farbung nach Pappenheim (62)

13. TRENNUNG DER KOMPONENTEN UND DEREN ONTOGENESE

Das genaue Studium der Steer'schen Trennbedingungen in der DEAE-Chromatographie zeigte, daß der Gradientverlauf zu steil war. Die Auftrennung von GowerI und HeideII gelang deshalb nicht (46). HeideII äußerte sich nur als Schulter von GowerI. Durch einen flacheren Salzgradienten wurden bessere Trennungen erzielt. Die Ausbeuten waren jedoch noch schlecht, weil viel Material auf dem Säulenkopf denaturierte.

Diagramm 8

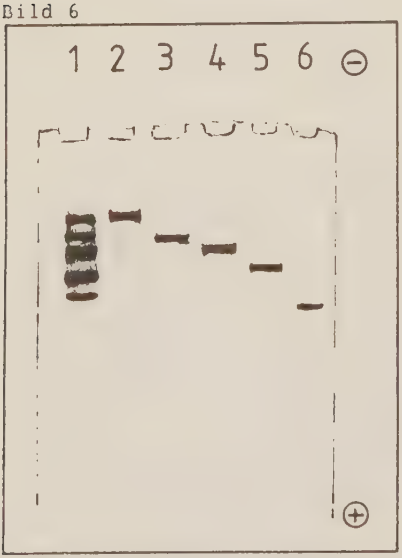


Komponententrennung an DEAE-Sephacel, Säule: Ø 1.6 x 15cm
Equilibrier und Probenpuffer: 20mM Tris/HCl pH 8.5, 2mM KCN
Gradient: 0 - 75mM NaCl im Startpuffer (15mM NaCl/100ml)
Fraktionen: 5ml/20min.
Die Gipfel sind nach den Komponenten bezeichnet.

Gute Ergebnisse wurden schließlich erzielt, nachdem ß-Mercaptoethanol im Puffersystem weggelassen wurde. Die Bedingungen sind in 1.2.2 beschrieben; die Trennungen erwiesen sind als sehr gut reproduzierbar. Das Diagramm 8 zeigt eine Trennung von Komponenten aus Embryonen mit 1.2 - 1.5cm KS.

Die Komponenten werden nacheinander gemaß abnehmender Basizität eluiert: Gower II - Gower I - Heide II - Heide I - HbA. Von den Gipfelfraktionen wurden Elektrophoresen unter nativen (Bild 6) und denaturierenden Bedingungen (Bild 7) angefertigt.

Bild 6



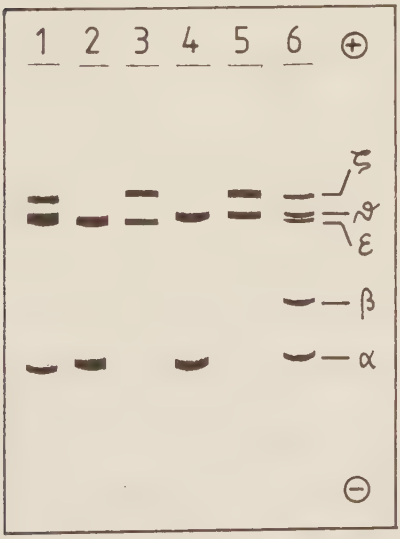
Polyacrylamid-Gelelektrophorese, nativ, 10%iges Plattengel, pH 8.7
Die Komponenten sind in der Reihenfolge ihrer Elution von links nach rechts aufgetragen.

Laufzeit: 2Std. bei 50mA
Färbung und Fixierung: Amidoschwarz in 7% Essigsäure

In den Rundgelen sind die Ketten der jeweiligen Komponenten in der gleichen Reihenfolge dargestellt (Bild 7). Die ε- und ζ-Ketten ließen sich zunachst mit der Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Alter (2) nicht trennen. Da sich Triton X-100 nur schwer pipettieren laßt, es aber die

elektrophoretische Mobilität der Proteine entscheidend beeinflußt, wurde erst durch Variation der Konzentration zwischen 0 - 3% die optimale Bedingung zur Auftrennung der embryonalen Ketten gefunden. Für die Darstellung von ε- und γ-Ketten liegt sie bei 1.5% Triton X-100. Schon dieser geringe Unterschied in der Elektrophorese deutet auf die sehr ähnliche Primärstruktur dieser β-Typ-Ketten hin.

Bild 7



Polyacrylamid-Gelelektrophorese, denaturierend im 12%igen Gel

von links nach rechts

Bahn 1, Gesamtlysat KS<2cm

Bahn 2, Gower II

Bahn 3, Gower I

Bahn 4, Heide II

Bahn 5, Heide I

Bahn 6, Gesamtlysat KS=4cm

Mit der DEAE-Säulenchromatographie und der Triton X-100 Elektrophorese war es nun auch möglich, die Aufeinanderfolge der Globinexpression zu studieren. Dazu wurden Trennungen von Komponenten aus Embryonen verschiedener Kopf-Steiß-Lange durchgeführt. Die Elutionsprofile sind in den Diagrammen 9 - 11 wiedergegeben.

Diagramm 9

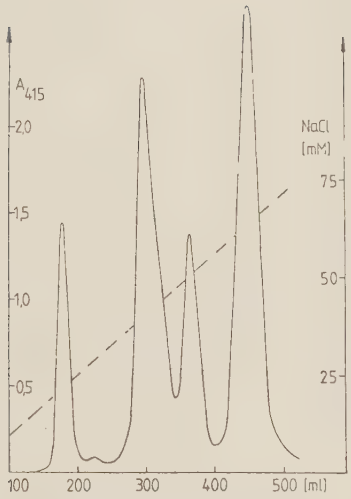


Diagramm 10

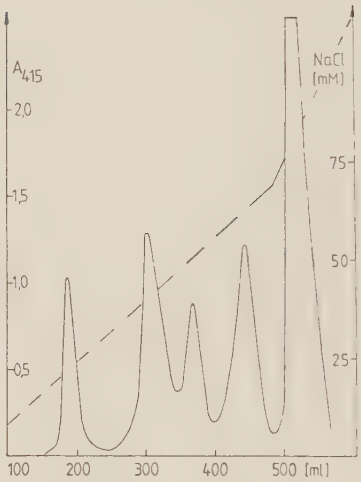
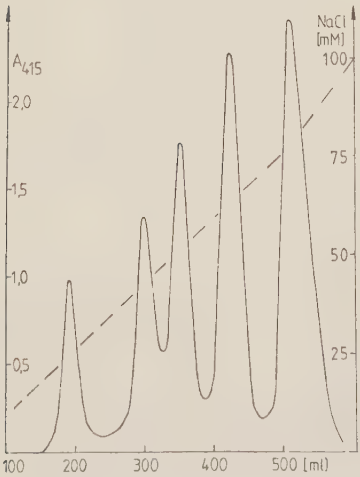


Diagramm 11



Säulenchromatographie an DEAE-Sephacel von Hämolysaten aus Embryonen verschiedener Kopf-Steiß-Länge. Die Bedingungen entsprechen denen unter Diagramm 8 beschriebenen.

Diagramm 9: KS < 2cm

Diagramm 10: KS > 4cm

Diagramm 11: KS 3,5cm

Folgendes Schema zeigt die prozentualen Anteile der Komponenten aller Trennungen und die daraus berechneten Werte für die Ketten. Die mit * gekennzeichneten Werte entstammen den Diagrammen 9-11.

KS / Kompon.	<2cm	2cm *	2.2cm	3-4cm	3.5cm	3.5cm *	4-5cm *
GowerII	14.9	10.7	12	6.9	6	5.6	5.8
GowerI	35.8	33.6	28	14.1	11.2	9.6	11.7
HeideII	14.1	16.2	24	6.5	10.8	10.1	6.1
HeideI	33.2	39.5	32	13.8	14.7	20.0	8.0
HbA	-	-	4	55.3	57.3	54.6	68.4
Ketten							
ζ	34.5	36.6	30	14	13	14.8	9.9
ε	25.4	22.2	20	10.5	8.6	7.6	8.8
δ	23.7	27.9	28	10.2	13.3	15.1	7.1
α	14.5	13.5	20	34.4	37.6	35.2	40.2
β	-	-	2	27.7	28.7	27.3	34.2

Ab einer KS von 2.2cm wird schon HbA gebildet. Bei Embryonen < 2cm sind nur die embryonalen Komponenten nachweisbar, wobei GowerI und HeideI überwiegen. Mit steigender Größe der Embryonen verringert sich die Syntheserate der embryonalen Komponenten, gleichzeitig beginnt die Bildung von β-Ketten. Die Expression der ζ- u. δ-Ketten geht langsamer zuruck als die der ε-Ketten. Bei 3.5cm KS bestehen bereits mehr als 50% des roten Blutfarbstoffes aus adultem Material, die embryonalen Komponenten sind noch je mit knapp 10% vertreten. Diese Beobachtung läßt sich auch durch die Triton X-100 Elektrophorese belegen (Bild 7, Bahn 1 und 6), insbesondere der schnellere Rückgang der ε-Ketten. Diese Befunde werden in der Diskussion weiter erörtert.

14. KETTENTRENNUNG

Die Trennung der Ketten bereitete größte Schwierigkeiten, sie war aber das essentielle Experiment zur erfolgreichen Sequenzierung. Zunächst wurde versucht über die HPLC mit mehreren Säulen und Puffersystemen eine Auftrennung der embryonalen Ketten zu erreichen. Die unbefriedigenden Ergebnisse, sowie die schlechte Reproduzierbarkeit, zwangen mich zur Rückkehr zur konventionellen Methode der Austauscher-Chromatographie. Mit der variierten Technik nach Clegg (6) konnten schließlich die Ketten von GowerI und HeideI isoliert werden. Der entscheidene Kniff bestand darin, die am Ende des Gradienten stark schmierenden β-Typ Ketten (ε und γ) durch einen parabolischen Gradientenverlauf als Gipfel zu eluieren. Außerdem wurden die Proben bis zur Hälfte ins Gel eingerührt und so eine bessere Ausnutzung der Austauscherkapazität erreicht. Die ζ-Ketten erscheinen mit der Front, wenn der Startpuffer < 15mM Phosphat enthält, bei 10mM Phosphat-Konzentation werden sie zu Beginn des Gradienten (Diagramme 12 u. 13) eluiert. Die Trennung der Komponenten GowerII (α_2/ε_2) und HeideII α_2/γ_2) gelang in diesem System nicht. Die α-Ketten werden bei ähnlicher Ionenstärke wie die ε- und γ-Ketten chromatographiert. Die Proteine der Gipfel wurden mit der Gel Elektrophorese auf ihre Einheitlichkeit untersucht (Bild 8). Die günstigsten Trennbedingungen sind in Abschnitt 2.2 beschrieben.

Diagramm 12

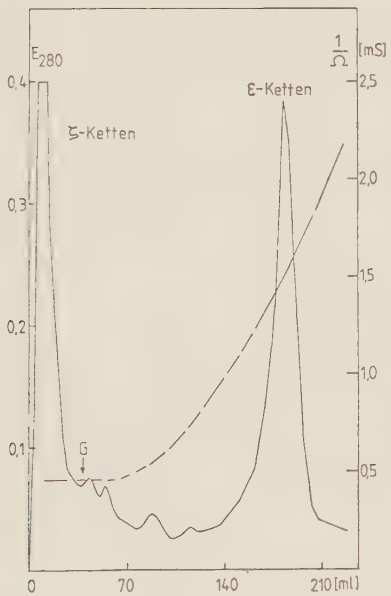
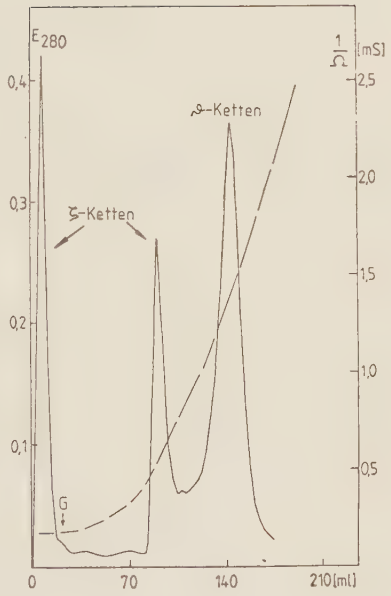


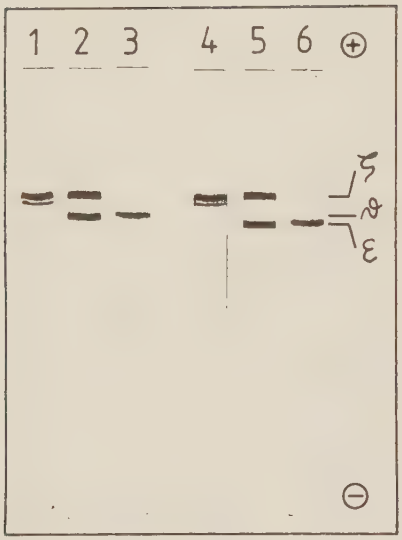
Diagramm 13



Kettentrennungen von GowerI und HeideI an CM-Cellulose
Säule: Ø 1.6 x 4cm, Startpuffer: links 10, rechts 15mM
Natrium-Phosphat pH 6.8, 8M Harnstoff, 100mg DTE/l.
Gradient: 10 bzw. 15 - 150mM Natrium-Phosphat pH 6.8
in einem parabolischen System.

Die Ionenstärke des Startpuffers war bei der Trennung von HeideI schwächer gewählt, so daß die ζ-Ketten erst zu Beginn des Gradienten eluiert werden.

Bild 8



Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen, 12%iges Gel

von links nach rechts:

Bahn 1 = ζ-Ketten

Bahn 2 = Heide I

Bahn 3 = ϑ-Ketten

Bahn 4 = ζ-Ketten

Bahn 5 = Gower I

Bahn 6 = ε-Ketten

Hier ist zu bemerken, daß bisher keine Isolierung von ζ-Ketten an CM-Cellulose beschrieben wurde.

15. STRATEGIE DER SEQUENZANALYSE

Die Sequenzierung der ζ-Ketten wurde von Herrn Dr. H. Aschauer übernommen: er hatte kurz zuvor die Primärstruktur der menschlichen ζ-Ketten aufgeklart (24,25).

In Anbetracht des wenigen Materials sollte versucht werden, die Sequenz allein an Hand der tryptischen Peptiden zu erarbeiten. Durch die Moglichkeit des homologen Vergleiches mit den ε-Ketten des Menschen, sind die Fragmente leicht zuzuordnen und die Isolierung von Überlappungspeptiden uber-

flüssig. Aus den Daten der Aminosäurenanalyse und aus der denaturierenden Elektrophorese war zu erwarten, daß sich die ε- und γ-Ketten nur in wenigen Positionen unterscheiden. So sollte die Aufklärung der Primärstruktur von ε- und γ-Ketten sehr analog verlaufen. Im folgenden sind die Ergebnisse für die ε-Ketten beschrieben; soweit die Reinigung der γ-Ketten Peptide anders erfolgte, sind die Abänderungen in Klammern zugefügt oder gesondert beschrieben.

16. DIE TRYPTISCHE SPALTUNG DER KETTEN UND GELFILTRATION AN SEPHADEX G25

Von beiden Ketten wurden insgesamt drei Spaltungen an den Lysinen durch Trypsin nach 4.2 durchgeführt. Der lösliche Anteil wurde an Sephadex G25sf über eine 95cm (180cm G25f) Säule vorgetrennt, die "core" Fraktion direkt über die HPLC nach 5.2.1 aufgearbeitet. Die Gelfiltrationen sind in Diagramm 14 u. 15 dargestellt. Eine Vorfraktionierung an Sephadex ist gunstig, weil die Tryptophan haltigen Peptide in dieser Methode ein scheinbar kleineres Molekulargewicht haben und sich dadurch leicht von Peptiden gleicher Größe abtrennen lassen.

Diagramm 14

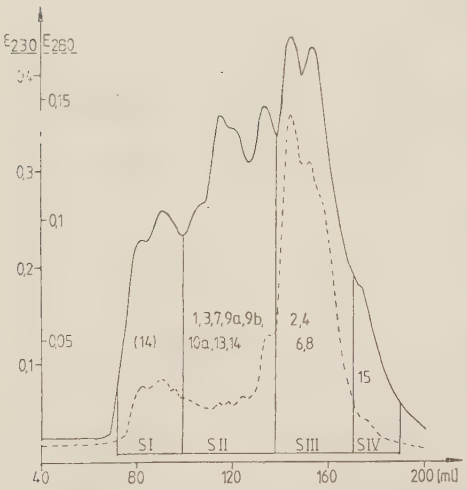
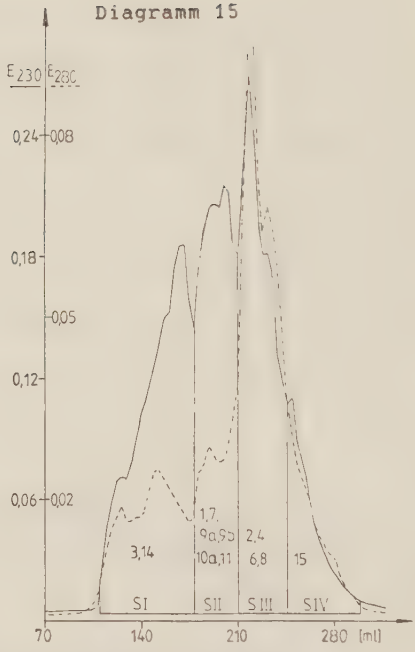


Diagramm 15



Chromatographie der tryptischen Peptide (losliche Fraktion) von ε- (links) und $\mathcal{S}$-Ketten (rechts) über Sephadex.

Säule: 1,6 x 95cm, G25sf
in 0,1M Essigsäure
Fraktionen: 2ml/30min
Probe: 16mg Protein in
2ml wässr. Lösung pH 2.5

Säule: 1,6 x 175cm, G25f
in 0,1M Essigsäure
Fraktionen: 3,5ml/30min
Probe: 10mg Protein in
2ml wässr. Lösung pH 2.5

Das Elutionsprofil wurde in vier Fraktionen aufgeteilt und mit der DC-Elektrophorese voruntersucht. In den ersten drei Fraktionen ist ein Fleck am Start zu sehen, der sich nicht Histidin positiv anfärben läßt. Wie sich im Laufe der Proteinreinigung herausstellte, handelt es sich um das schwer zu isolierende Tp5, das über alle Fraktionen "schmiert". Außer den Peptiden Tp5, Tp10b und Tp12 (Tp12+13) konnten alle übrigen tryptischen Fragmente aus den Sephadex-fraktionen isoliert werden.

DC Elektrophoresen der Fraktionen aus der Gelfiltration der Diagramme 14 u. 15

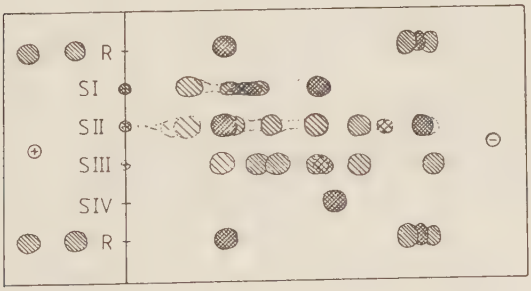
Die ε-Ketten Peptide:

Tp (14)

Tp 1,3,7,9a,b
10a,13,14,11
Tp 2,4,6,8

Tp 15

Die γ-Ketten Peptide:



Tp 3,14

Tp 1,7,9a,b
10a,11
Tp 2,4,6,8

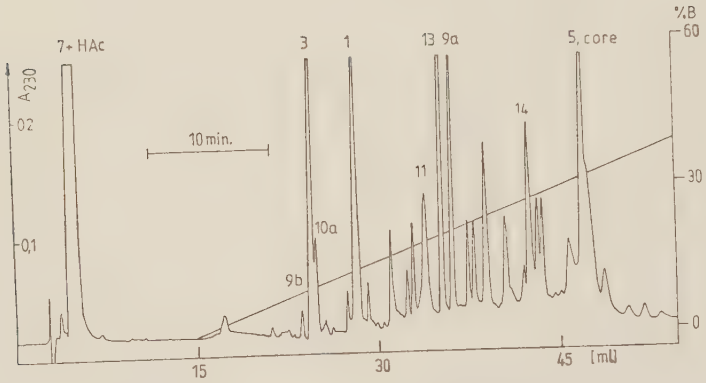
Tp 15

17. ISOLIERUNG DER PEPTIDE

Fast alle Peptide konnten mit Hilfe der HPLC in reiner Form isoliert werden. Die Sephadexfraktionen SI, SII und SIII wurden über HPLC nach 5.2.1 weiter aufgearbeitet. Die Peptide der ε-Ketten wurden an RP8, die der γ-Ketten an RP2 getrennt. Erstere hat bessere Trenneigenschaften insbesondere für kleine Peptide, die bei RP2 mit der Front erscheinen. Außerdem sind die Retentionszeiten in der ersten Hälfte des Gradienten konstanter. Bei RP2-Material sind allgemein die Ausbeuten an größeren Peptiden besser. Ein analytischer HPLC Lauf von SI der ε-Ketten ergab keine verwertbaren Peptide. Die Elutionsprofile sind in den

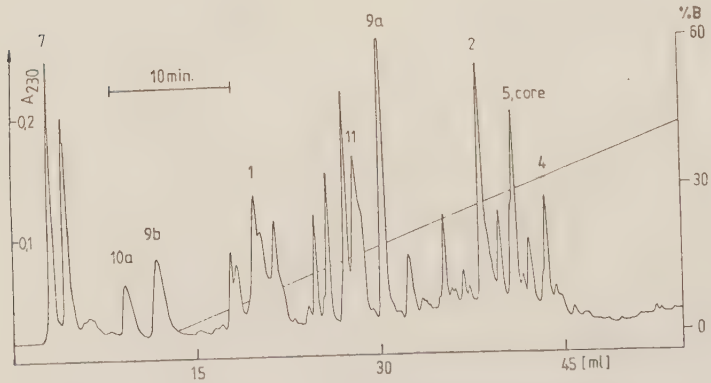
Diagrammen 16 u. 17 (18, 19 u. 20) dargestellt.

Diagramm 16



Trennung der Peptide ε SII durch HPLC an RP8
Säule: Ø 46 x 250mm, Rp8 7µm, LiChrosorb;
Puffer A: 50mM Ammonium-Acetat pH 6.0; Puffer B: 100% Acetonitril; Probe: ca. 50nM Peptid in 50µl verd. HAc

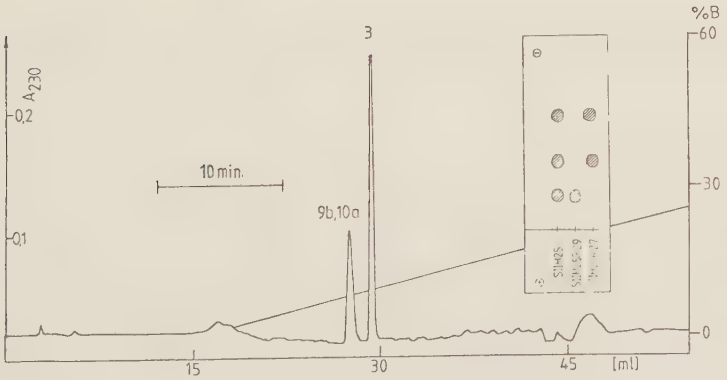
Diagramm 17



Trennung der Peptide ↬ SII durch HPLC an RP2

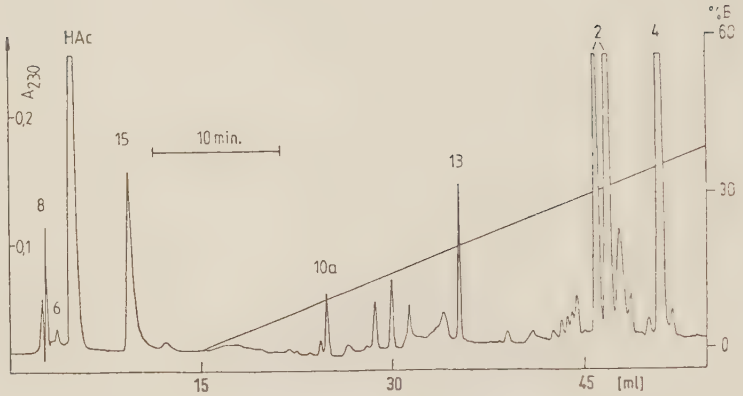
Die Gipfel werden in der Folge nach ihrer Retentionszeit bezeichnet. Die Zeiten sind der Einfachheit halber gerundet. So bedeutet z.B. SIIH25, Sephadexfraktion II, Retentionszeit 25. Bei Rechromatographie des Gipfels in der HPLC folgt die Erweiterung des Codes um die neue Retentionszeit, also SIIH25R30. SII25 der ε-Ketten (Diagramm 16) ist von zwei kleinen Gipfeln flankiert; bei zwei weiteren, präparativen Laufen gelang die Trennung nicht. Das lyophilisierte Gemisch wurde über HPLC rechromatographiert (Diagramm 18). R29 konnte als Tp3 analysiert werden, R27 war nicht einheitlich und ergab in der DC-Elektrophorese zwei Flecken. Beide Peptide wurden präparativ über die DC-Elektrophorese nachgereinigt. Nach der Analyse ist SIIH25R27E1 Tp9b, SIIH25R27E2 Tp10a.

Diagramm 18



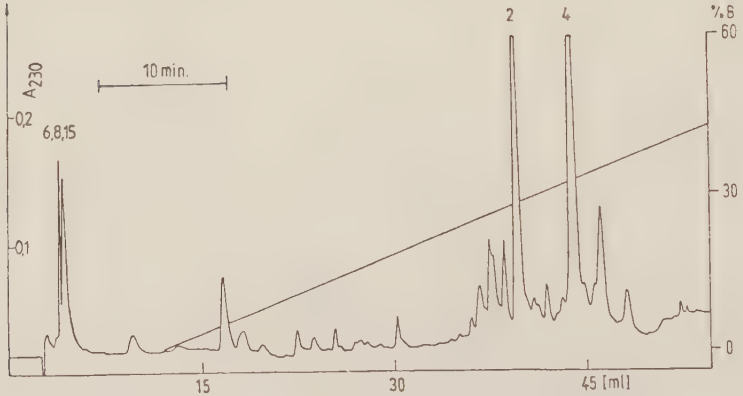
Rechromatographie von SIIH25, Bedingungen siehe Diagramm 16; der Gradient verläuft aber etwas flacher (0,7%/min). Die DC-Elektrophorese ist in das Diagramm eingezeichnet.

Diagramm 19



Trennung der Peptide ε SIII durch HPLC
Säule: Ø 46 x 250mm, Rp8 7µm, LiChrosorb;
Puffer A: 50mM Ammonium-Acetat pH 6.0; Puffer B: 100% Acetonitril; Probe: ca. 50nM Peptid in 50µl verd. HAc

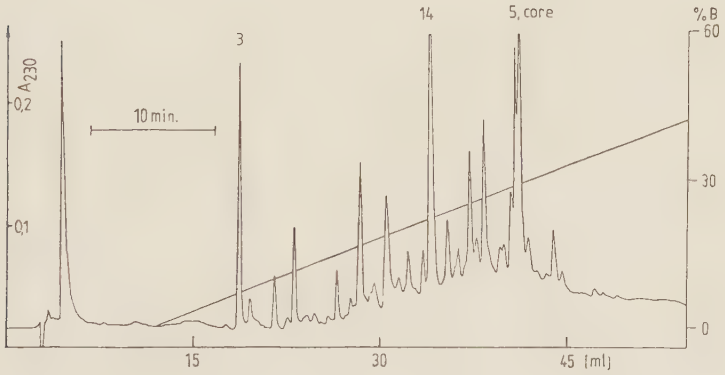
Diagramm 20



Trennung der Peptide ~~ε~~ SIII an RP2 durch HPLC

In dem Diagramm 19 fällt auf, daß das Tp2 in zwei Gipfeln eluiert wird. Die Analysen sind jedoch identisch. Vermutlich ist Tryptophan fur diese Aufspaltung verantwortlich. Dieses Phanomen war bei den anderen tryptophanhaltigen Peptiden nicht zu beobachten.

Diagramm 21

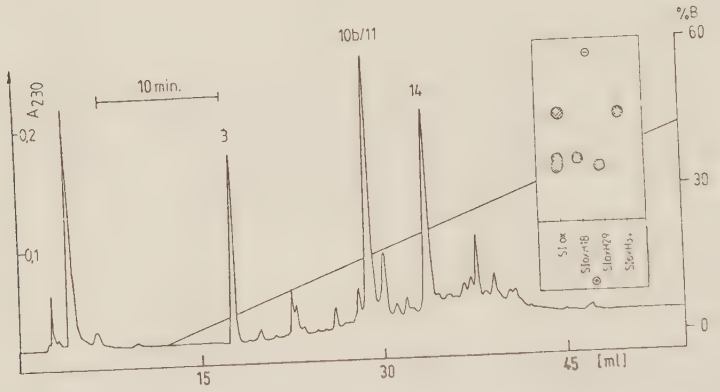


Trennung der Peptide ~SI an RP2 durch HPLC. Die Bedingungen sind bei Diagramm 16 beschrieben

Das Tp10b konnte trotz intensiver Suche nicht gefunden werden, obwohl Tp10a und Tp11 in guten Ausbeuten vorhanden waren. Möglicherweise verursacht das Cystein Aggregationen, so daß das Peptid zusammen mit dem "core" ausfällt. Deshalb wurden die Ketten 15min bei -10°C mit Perameisensäure oxidiert. Die anschließende tryptische Spaltung wurde im pH Bereich von 8 - 9 durchgeführt. Unter diesen Bedingungen geht die Bindung zwischen Tp10b und 11 nur schwer auf. Die Sulfongruppe des oxidierten Cysteins bildet vermutlich mit der ε Amino-Gruppe des Lysins eine Salzbrücke und verhindert

die Hydrolyse. Die saure Umgebung dieses Lysins beeinträchtigt zusätzlich die Spaltung. Nach Vorfraktionierung an Sephadex wurde der aufsteigende Teil des ersten Gipfels (SIox) an RP2 chromatographiert. Das Profil, sowie die dazu gehörige DC-Elektrophorese ist in Diagramm 22 abgebildet. Der Gipfel H29 ist das gesuchte Peptid in guter Ausbeute.

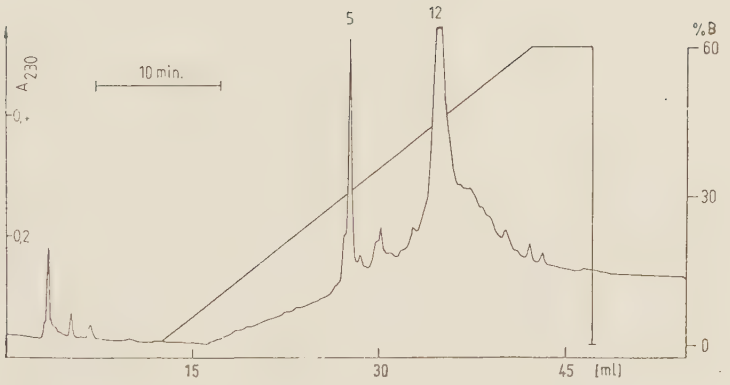
Diagramm 22



Die Bedingungen sind denen in Diagramm 16 entsprechend, als Umkehrphase wurde aber RP2 als Säulenmaterial verwendet.

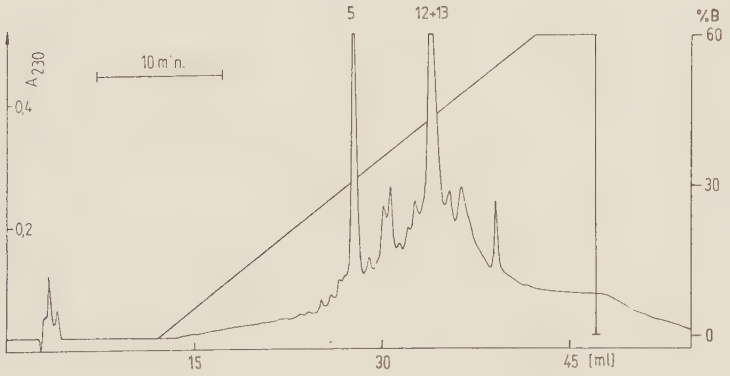
Die Isolierung der Peptide Tp5 und Tp12 wurde erst in Verbindung mit der "core" Aufarbeitung der γ-Ketten gelöst. Wichtig war, das "core" sofort nach der Ausfallung weiter aufzuarbeiten. Die Trennung über die HPLC im TFA-System ist in Abschnitt 5.2.2 beschrieben, die Kurven für ε- und γ-Ketten in den Diagrammen 23 u. 24 dargestellt.

Diagramm 23



Trennung der ε "core"-Fraktion an RP2 durch HPLC

Diagramm 24



Trennung der ε"core"-Fraktion an RP2 durch HPLC
Säule: ø 46 x 250mm, RP2 7µm, LiChrosorb;
Puffer A: 0.1%TFA pH 3.0; Puffer B: 100% Acetonitril;
Gradient: 2% Puffer B pro min, 1ml/min;
Probe: ca. 150nM Peptid in 150µl Puffer A

Tp12 der ε-Ketten wurde in guter Ausbeute erhalten, Tp5 zu nur ca. 8%, da es auch in anderen Fraktionen gefunden wurde (siehe oben). Die 30nM reichten leicht für die Sequenzierung und Identifizierung der PTH-Aminosäuren über die HPLC.

Die HPLC Chromatogramme der γ-Ketten sind komplexer als die der ε-Ketten. Die Zuordnung der Peptide war dadurch erschwert, daß sich im Ansatz ca. 25% ζ-Ketten befanden. Diese Verunreinigung kommt aus den anfanglichen Schwierigkeiten bei den Kettentrennungen. Dennoch gelang die Reinigung aller Peptide über die HPLC mit RP2 als Säulenmaterial. Trotz intensiver Suche konnten nur Spuren von Tp13 gefunden werden. Der HPLC Gipfel H35 aus der "core" Fraktion (Diagramm 24) enthält nach Analyse Tp12 und Tp13. Da das Verhaltnis Lys:Arg jedoch fast 2 war, und in der DC-Elektrophorese nur ein Fleck am Start blieb, lag die Vermutung nahe, daß das Arginin ausgetauscht sein wurde. Die Sequenzanalyse bestätigte diese Annahme: Ein Arg ist durch ein Gly ersetzt, d.h. es existiert kein Tp13, stattdessen ein verlängertes Tp12 mit 28 Aminosäurenresten.

Eine zusammenfassende Darstellung der Reinigung aller Peptide gibt Tabelle IV wieder. In der Tabelle V sind alle Analysen der ε- und in VI die der γ-Ketten aufgelistet.

Tabelle IV

Reinigungsschema der tryptischen Peptide

Abkürzungen: S = Sephadex
H = HPLC
HR= HPLC-Rechromatographie
E = DC-Elektrophorese
co= "core"-Fraktion
ox= oxidierter Spaltansatz

1.) Embryo ε-Ketten Peptide

Tp	1	2	3	4	5	6	7	8	9a	9b	10a	10b/11	11	12	13	14	15
S	II	III	II	III	co	III	II	III	II	II	II	Iox	II	co	II	II	IV
H	28	46	25	51	27	3	5	3	36	25	25	29	34	34	35	43	
HR			29							27	27						
E						1		2		1	2						

2.) Embryo γ-Ketten Peptide

Tp	1	2	3	4	5	6	7	8	9a	9b	10a	10b/11	11	12+13	14	15
S	II	III	I	III	co	III	II	III	II	II	II	Iox	II	co	II	IV
H	20	40	19	44	30	4	3	4	30	12	9	29	28	36	34	
E						1		2								

Tabelle V

Analysen der tryptischen Peptide der ε-Ketten

Pos.	Tp1 1-8	Tp2 9-17	Tp3 18-31	Tp4 31-40	Tp5 41-59	Tp6 60-61	Tp7 62-65	Tp8 66	Tp9a 67-76	Tp9b 77-82
Asp	-	-	1.03	-	3.38(3)	-	-	-	1.13	3.30
Thr	0.92	0.99	-	1.02	-	-	-	-	0.95	-
Ser	-	1.18	0.91	-	3.67(4)	-	-	-	1.06	-
Glu	2.21	-	3.12	1.05	-	-	-	-	-	-
Pro	-	-	-	0.98	2.18	-	-	-	-	-
Gly	-	1.06	3.21	-	2.25	-	0.98	-	1.05	-
Ala	1.10	1.01	1.06	-	0.77	-	0.83	-	1.00	-
Cys	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Val	0.88	0.86	2.57(3)	1.82	-	1.07	-	-	-	-
Met	-	-	-	-	2.21	-	-	-	-	0.56
Ile	-	0.77	-	-	0.72	-	-	-	-	-
Leu	-	1.07	-	2.02	-	-	-	-	1.00	1.02
Tyr	-	-	-	0.65	-	-	-	-	-	-
Phe	0.93	-	-	-	2.73	-	-	-	0.92	-
Trp	-	(1)	-	(1)	-	-	-	-	-	-
Lys	1.04	0.98	-	-	0.94	0.93	1.23	(1)	1.01	1.12
His	0.92	-	-	-	-	-	0.96	-	-	-
Arg	-	-	1.09	1.09	-	-	-	-	-	-
Summe	8	9	13	10	19	2	4	1	10	6

Pos.	Tp10a 83-87	Tp10b+ Tp11 88-104	Tp12 105-120	Tp13 121-132	Tp14 133-144	Tp15 145-146	Summe 1 - 146	Globin 1 - 146
Asp	-	2.99	1.26	-	-	-	12	12.78(12
Thr	0.93	-	-	0.93	1.04	-	8	7.32(8
Ser	-	0.89	1.12	-	-	-	8	8.00
Glu	-	2.13	-	3.39(4)	-	-	12	11.93
Pro	-	0.87	-	0.86	-	-	5	4.68
Gly	1.11	-	2.15	-	1.13	-	12	11.29(12
Ala	1.09	-	1.26	1.75	3.72	-	14	15.46(14
Cys	-	1.04	-	-	-	-	1	1.03(ox
Val	-	1.01	0.81	0.96	1.92	-	15	14.23(15
Met	-	-	0.92	-	-	-	4	3.85(ox
Ile	-	-	2.10(3)	-	-	-	5	3.84(5)
Leu	-	2.90	3.24	-	2.10	-	13	14.27(13
Tyr	-	-	-	-	-	0.74	2	1.90
Phe	0.98	1.03	1.10	1.09	-	-	9	9.13
Trp	-	-	-	(1)	-	-	3	(3)
Lys	0.93	1.05	-	1.02	1.00	-	11	11.23
His	-	2.05	1.06	-	1.09	1.26	7	6.87
Arg	-	1.04	0.96	-	-	-	5	5.05
Summe	5	17	16	12	12	2	146	146

Tabelle VI

Analysen der tryptischen Peptide der α-Ketten

Pos.	Tp1 1-8	Tp2 9-17	Tp3 18-31	Tp4 31-40	Tp5 41-59	Tp6 60-61	Tp7 62-65	Tp8 66	Tp9a 67-76	Tp9b 77-82
Asp	-	-	1.13	-	3.03	-	-	-	1.03	2.93
Thr	0.94	1.13	0.95	1.08	-	-	-	-	0.97	-
Ser	-	1.12	-	-	4.14	-	-	-	0.95	-
Glu	2.13	-	2.89	1.17	-	-	-	-	-	-
Pro	-	-	-	1.01	1.97	-	-	-	-	-
Gly	-	2.13	3.15	-	2.09	-	1.10	-	1.03	-
Ala	1.00	-	0.99	-	0.98	-	1.00	-	1.03	-
Cys	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Val	1.00	0.94	2.85	1.56(2)	-	0.93	-	-	1.94	-
Met	-	-	-	-	1.75*	-	-	-	-	0.90
Ile	-	0.77	-	-	0.95	-	-	-	-	-
Leu	-	1.27	-	1.99	-	-	-	-	1.03	1.05
Tyr	-	-	-	1.18	-	-	-	-	-	-
Phe	0.94	-	-	-	3.13	-	-	-	1.04	-
Trp		(1)	-	(1)	-	-	-	-	-	-
Lys	1.06	0.70	-	-	0.96	1.07	1.00	1.00	0.98	1.06
His	0.92	-	-	-	-	-	0.90	-	-	-
Arg	-	-	0.95	1.07	-	-	-	-	-	-
Summe	8	9	13	10	19	2	4	1	10	6

Pos.	Tp10a 83-87	Tp10b+ Tp11 88-104	Tp11 96-104	Tp12+13 105-132	Tp14 133-144	Tp15 145-146	Summe 1-146	Globin 1 - 146
Asp	-	2.89	2.04	1.43(1)	-	-	12	13.26(12)
Thr	0.98	-	-	1.07	1.02	-	8	7.14(8)
Ser	-	1.08	-	1.32	-	-	8	7.96
Glu	-	2.24	1.08	3.33(4)	-	-	12	12.09
Pro	-	0.95	0.85	1.10	-	-	5	4.63
Gly	1.00	-	-	2.92	1.12	-	14	13.13(14)
Ala	1.01	-	-	2.57(3)	3.77	-	13	14.42(13)
Cys	-	0.91*	-	-	-	-	1	0.96(ox)
Val	-	1.24	1.00	1.62(2)	1.88	-	15	14.17
Met	-	-	-	0.95*	-	-	4	4.23(ox)
Ile	-	-	-	2.03(3)	-	-	5	3.93(5)
Leu	-	2.72	1.05	3.64(3)	2.11	-	13	14.05(13)
Tyr	-	-	-	-	-	0.87	2	1.81
Phe	1.03	0.95	1.02	1.94	-	-	9	9.10
Trp	-	-	-	(1)	-	-	3	(3)
Lys	0.98	1.03	-	0.75	0.96	-	12	12.14
His	-	2.11	1.01	1.29	1.13	1.13	7	7.12
Arg	-	0.73	1.01	-	-	-	3	3.09
Summe	5	17	9	28	12	2	146	146

18. SEQUENZANALYSE

Die N-terminale Sequenzanalyse der ε- und γ-Ketten war schon von Steer mit 30 Abbauschritten an den Komponenten HeideII, GowerI und GowerII durchgeführt worden. Die drei unterschiedlichen Reste in dem Fragment Tp2 beider Ketten konnten in dieser Arbeit durch die Analysen sowie durch die Sequenzierung bestätigt werden. Die gereinigten Peptide wurden, wie in den Methoden unter Abschnitt 8 beschrieben, automatisch nach Edman-Begg abgebaut. In der Regel wurde das "Quadrol"-Programm verwendet, nachdem die Peptide mit Reagens IV umgesetzt worden waren. Alle Schritte konnten einwandfrei entweder über TCL-Chromatographie oder bei Sequenzerläufen mit weniger als 50nM mit der HPLC identifiziert werden. Die Arginyl-Peptide wurden in Diethylaminopropin als Kupplungspuffer abgebaut, ebenso Tp12+13 der γ-Ketten. Tp5 bereitete auch hier wieder Schwierigkeiten: Im "Quadrol"-Programm fielen die Ausbeuten nach der Sequenzierung des ersten Methionins stark ab, die folgenden zwei Serine konnten nur noch vermutet werden, und beim zweiten Methionin war die Identifizierung nicht mehr möglich. Tp5 der γ-Ketten wurde daraufhin mit Reagens I umgesetzt und im "Propin"-Programm ohne Probleme sequenziert. Der Abbau der Peptide, die aus dem "core"-Bereich über die HPLC im TFA-System isoliert worden waren, zeichnete sich durch sehr gute Ausbeuten aus, und zeigte nahezu keine Überlappungen. Danach war es auch moglich die restlichen 30nM Tp5 der ε-Kette abzubauen. Dieses Peptid ist in beiden Ketten

identisch. Das Schema auf Seite 64 gibt die Strategie der Sequenzierung wieder. Die Abbildung 2 zeigt alle exprimierten Globin-Gene des Schweines. Die embryonalen Ketten wurden den entsprechenden adulten gegenüber gestellt. In Abbildung 3 sind ζ- und ε-Ketten getrennt dargestellt und die Helix-Bereiche eingezeichnet. In der Diskussion werden die Reste der Aminosäuren nach ihrer Position in den Helices bezeichnet.

Sequenzierschema der ε-Ketten

Sequenzierschema der γ-Ketten

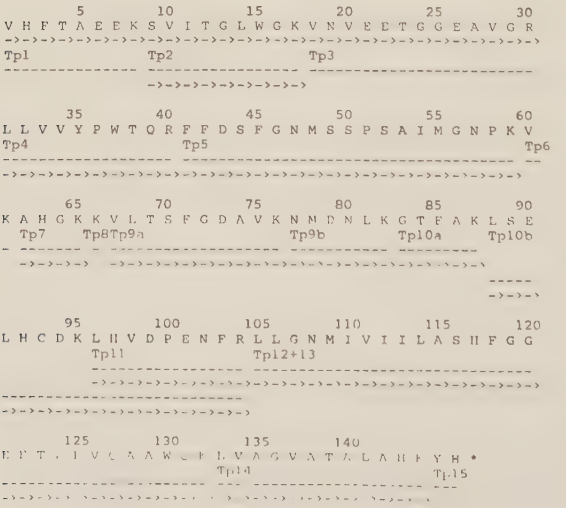


Abbildung 2

Homologer Vergleich der Primärstrukturen aller exprimierten Hämoglobinketten vom Hausschwein.
Die embryonalen Ketten wurden den adulten gegenüber gestellt.

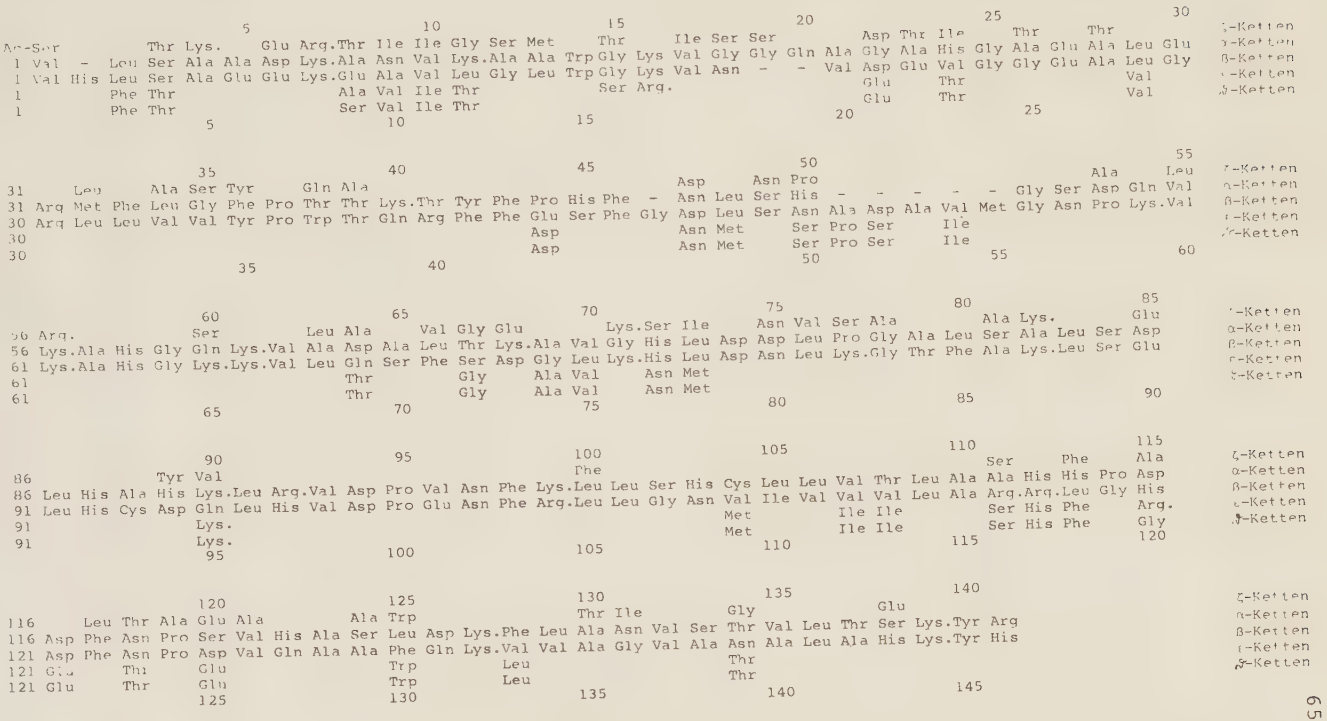
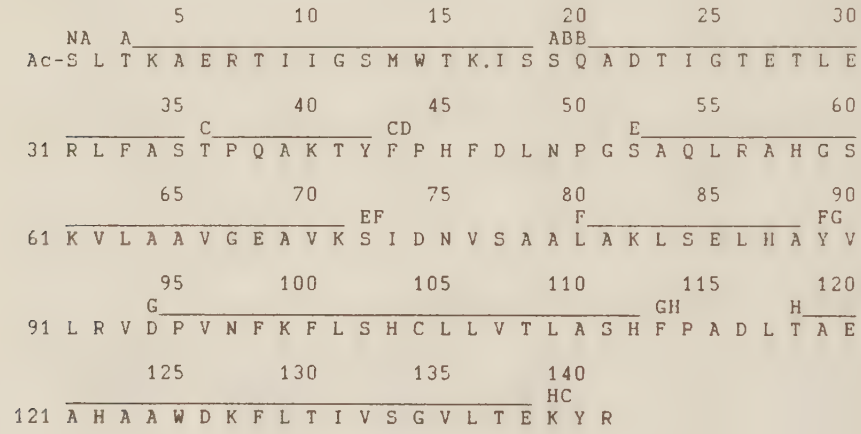


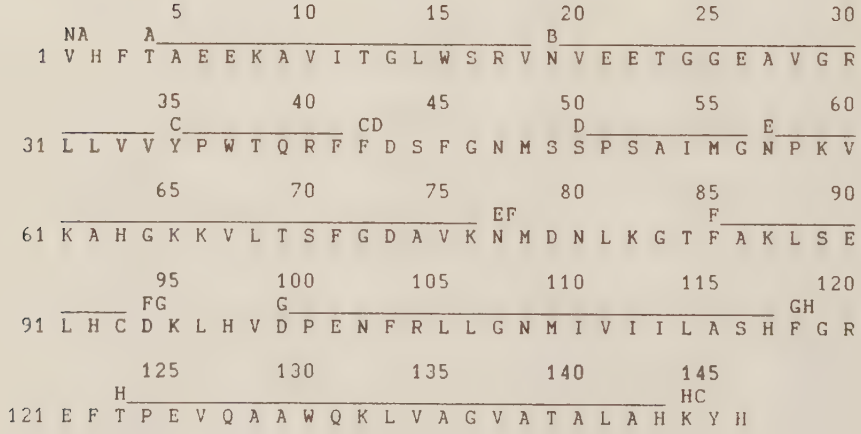
Abbildung 3

Darstellung der helikalen Bereiche in den embryonalen Ketten

ζ-Ketten



ε-Ketten



Die helikalen Bereiche wurden durch Linien über den Ketten gekennzeichnet und von A bis H bezeichnet. Die interhelikalen Regionen wurden entsprechend mit AB, CD usw. bezeichnet.

IV. D I S K U S S I O N

19. DIE EVOLUTIONAREN UND ATMUNGSPHYSIOLOGISCHEN ASPEKTE AUS DEN SEQUENZDATEN DES BISAMHAMOGLOBINS

19.1 Die Stellung des Bisams innerhalb der Nagetiere

Bei der Gegenüberstellung der Humansequenz (17) mit mehreren Sequenzen aus der Ordnung der Nagetiere (Rodentia), sowie des Kaninchens, des Spitzhörnchens (Tupaia) und des Känguruhs (59), fallen Bereiche auf, die für die Nager spezifisch sind (Abbildung 4 und 5). Nur die zur Humansequenz abweichenden Reste sind wiedergegeben, und die davon den Nagetieren eigenen sind durch Umrahmung hervorgehoben. Für Bisam und Hamster (38) treten die meisten Gemeinsamkeiten auf. In den α-Ketten finden sich 12, in den β-Ketten 19 Unterschiede. Des weiteren fällt auf, daß die Sequenzen des Bisams und der Hausmaus homologer sind als die von Bisam und Ratte. Alle vier Arten gehören zur Überfamilie der Mäuseartigen (Muroidae), Hamster und Bisam darin zur Familie der Wühler (Cricetidae), Ratte und Maus zur Familie der Mäuse (Muridae). In folgender Tabelle VII sind die Unterschiede aller untereinander verglichenen Sequenzen zusammengefaßt.

Abbildung 4

Homologer Vergleich von α-Ketten verschiedener Saugetiere. Die Abkürzungen sind unter der Tabelle VII auf Seite 70 erleutert.

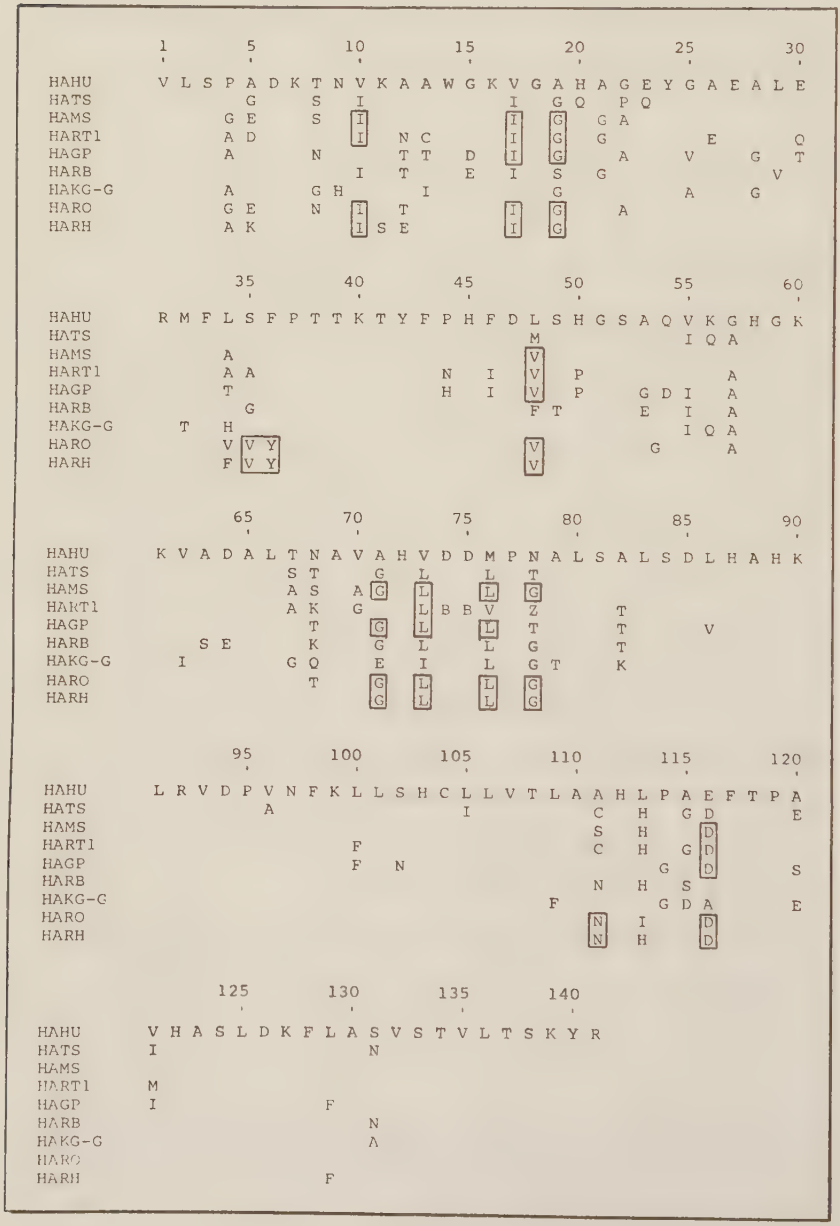


Abbildung 5

Homologer Vergleich von β-Ketten verschiedener Säugetiere. Die Abkürzungen sind unter der Tabelle VII auf Seite 70 erleutert.

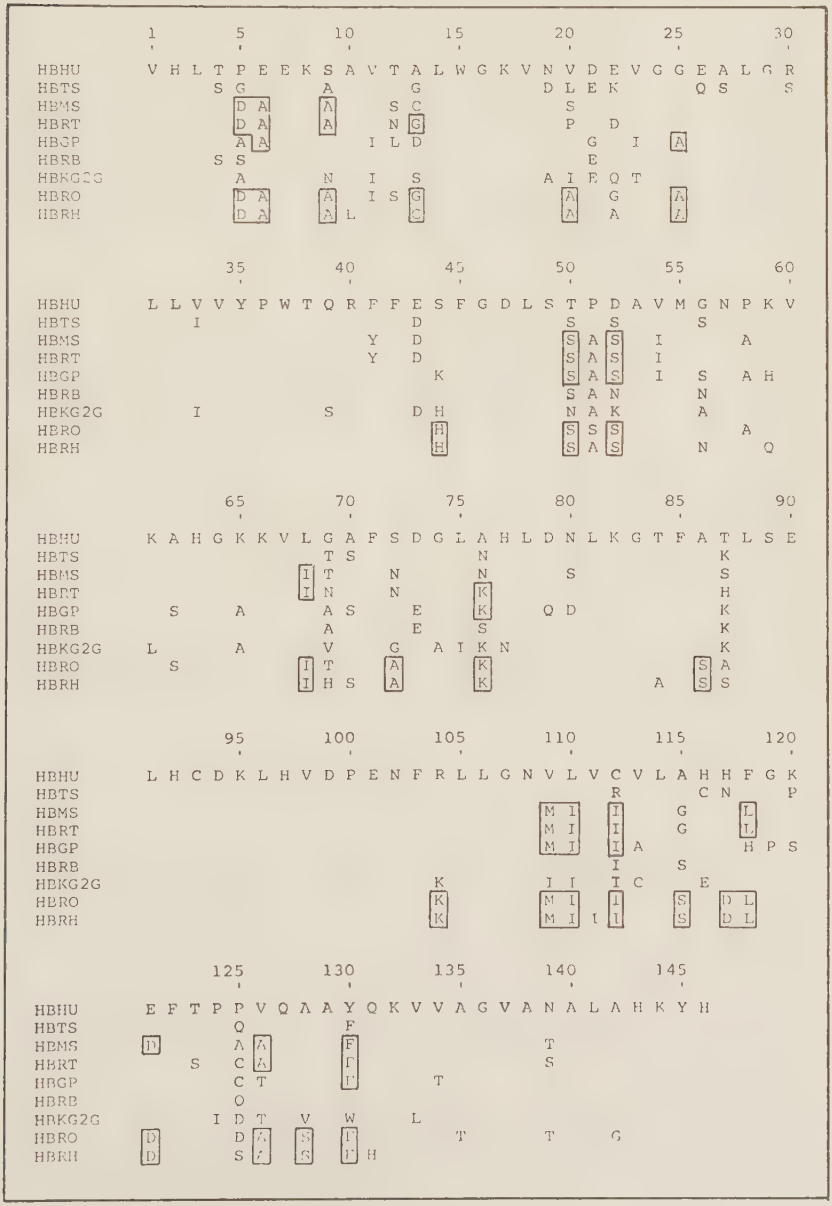


Tabelle VII

Austausche in den α-Ketten:

	HAHU	HATS	HAMS	HART1	HAGP	HARB	HAKG-G	HARO	HARH
HAHU		27	20	32	34	25	27	22	19
HATS	29		22	34	35	28	33	24	26
HAMS	23	25		25	33	25	33	13	15
HART1	35	38	27		35	33	43	30	28
HAGP	38	41	37	39		37	36	27	32
HARB	27	32	28	35	43		37	23	24
HAKG-G	34	41	38	48	44	44		34	34
HARO	26	29	15	32	34	25	43		12
HARH	24	32	18	33	42	27	45	15	

Austausche in den β-Ketten:

	HBHU	HBTS	HBMS	HBRT	HBGP	HBRB	HBKG2G	HBRO	HBRH
HBHU		26	29	28	36	14	38	36	36
HBTS	32		35	34	42	24	41	42	40
HBMS	36	39		13	35	30	45	23	28
HBRT	36	40	15		35	29	42	26	27
HBGP	50	54	47	46		32	44	38	40
HBRB	16	26	36	37	45		37	37	34
HBKG2G	53	57	60	60	62	51		45	46
HBRO	43	49	25	30	47	43	61		19
HBRH	44	49	33	32	50	41	65	23	

Die Zahlen über der Diagonalen geben die veränderten Aminosäuren, unter der Diagonalen die minimale Anzahl der Nucleotidaustausche wieder. HA = α-Ketten, HB = β-Ketten. HU = Mensch, TS = Spitzhörnchen, MS = Hausmaus, RT = Ratte, GP = Meerschweinchen, RB = Kaninchen, KG = Känguruh, RO = Bisam, RH = Hamster.

In den peptidvergleichenden (homologer Vergleich der Bruttoformeln) Arbeiten von Genoux et al. (36,37) über die Microtini, lassen sich für den Bisam in den α-Ketten 9, in den β-Ketten 20 Sequenzen nicht bestätigen. Auch die Sequenzen, die für die Lemminge postuliert wurden, wären zu korrigieren.

Beim Bisam folgen in den β-Ketten von Position 49-52 vier

Serine aufeinander, die sich in der PTH-Auswertung über HPLC problemlos identifizieren ließen. Die gleiche Sequenzfolge wurde auch bei einem embryonalen β-Ketten Typ im Kaninchen gefunden (59).

Zur Radation der Microtini läßt sich mit Hilfe der Sequenzanalyse nur bedingt eine Aussage machen. Die Anzahl der Austausche gibt wohl Aufschluß über die Verwandtschaftsnähe, die zeitliche Einordnung eines gemeinsamen Vorfahren ist aber nur in Kombination mit paläontologischen Daten möglich. Eine solche Festlegung nur aus Sequenzdaten würde eine kontinuierliche Mutationsrate voraussetzen. Diese aber ist in Folge der unübersichtlichen Parameter, wie Größe der Population, Zahl der Nachkommen und Generationszeit, wie auch selektiver Druck, oder Konservierung in Evolutionsnischen nicht gewährleistet. Ein weiterer wichtiger Grund ist die Möglichkeit der Gene zu rekombinieren oder konvertieren, ein Mechanismus der für das menschliche γ-Globin-Gen postuliert wird (53). Die Eichung der "Evolutionsuhr" ist deshalb nur schwer möglich. Dennoch wurde immer wieder versucht, eine proteinspezifische Mutationsrate zu finden. Nach Wilson ist eine Mutationseinheit die Zeit in ma, die verstreicht, bis 1% Aminosäurenaustausche stattgefunden haben (35). Für die α-Ketten des Hämoglobins beträgt sie 3.7ma, für die β-Ketten 3.3ma. In der Tat treten bei Säugetieren immer mehr Austausche in den β-Ketten auf als in den α-Ketten. Bei Vögeln ist dieses Verhältnis umgekehrt (57). Für Bisam und Hamster, deren Sequenzen (α- + β-Ketten) sich um 11% unterscheiden, würde nach Wilson ein gemeinsamer Vorfahre vor ca. 35ma gelebt

haben, zu einer Zeit, in der Alte und Neue Welt noch über die Beringstraße verbunden waren.

19.2 Die Atmungsphysiologie aus molekularer Sicht

Der Bisam wurde erst 1905 von Fürst Colloredo-Mannsfeld in Europa eingeführt. Auf Grund seiner außerordentlichen Anpassungsfähigkeit hat er sich in kurzer Zeit zu einer Landplage entwickelt. Er lebt in einem Höhlensystem in Uferböschungen, ernährt sich rein vegetarisch und kann bis zu 10min tauchen. Von Tieren in ähnlichen Lebensräumen ist eine veränderte Sauerstoff-Bindungskurve beschrieben (34). Die Sequenz des Bisamhamoglobins fallt jedoch in Bezug auf die Sauerstoffaffinität nicht aus der Reihe: die DPG-Bindungsstellen sind verglichen mit dem Blutfarbstoff des Menschen identisch, ebenso die $\alpha 1$ - $\beta 2$ Berührungsstellen. Lediglich im $\alpha 1$ - $\beta 1$ Bindungsbereich sind in den α- und β-Ketten jeweils 4 Reste verändert. Diese Veranderungen liegen sich sterisch genau gegenüber: βG14 Cys->Ile und βG17 Ala->Ser haben in den α-Ketten G18 Ala->Asn als Partner. Die Reste αB15 Leu->Val und αB16 Ser->Val haben ihr Gegenstück in βH3 Pro->Asp und βH6 Ala->Ser. Durch den Austausch αB16 Ser->Val geht eine H-Brücke verloren. Diese veränderten Reste liegen (außer βH3 Asp) im hydrophoben Bindungsbereich der dimeren $\alpha 1$ - $\beta 1$ Struktur und sind in ihren Eigenschaften gleich geblieben. Die Asparaginsäure zeigt nach außen und beibt ohne strukturellen Folgen. Lediglich der Austausch αC1 Phe->Tyr kann über ein H_2O-Molekül zu dem Stickstoff βG10 Asn eine Bindung eingehen und damit die $\alpha 1$ - $\beta 1$ Struktur versteifen. Das konnte zu einer höheren intrinsischen

Affinität führen.

Die Mutation, die in der Häm-Tasche zu dem Austausch βCD3 Ser->His führt, schafft für die chromophore Gruppe die gleichen Bindungsverhältnisse wie sie in den α-Ketten vorliegen: Der Imidazolstickstoff bildet zum Propionsäurerest III des Hams eine H-Brücke aus. Dieses ist dadurch fester gebunden als bei β-Ketten mit Serin in CD3. Die Auswirkung auf die Bindungskurve des Sauerstoffs und die Kooperativität ist noch zu prüfen.

Alle anderen veränderten Aminosäurereste liegen an der Oberfläche des Molekuls und dürften in Bezug auf die Regulation der Atmung kaum von Bedeutung sein.

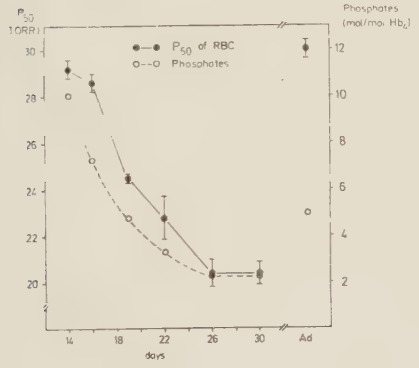
20. DIE EMBRYONALEN HÄMOGLOBINE BEIM SCHWEIN

20.1 Die Sauerstoffversorgung im Uterus

Das außergewöhnlich teilungsaktive Gewebe des Embryos im Uterus hat einen sehr intensiven Stoffwechsel. Zu Beginn der Gestation gelangen alle Aufbaustoffe durch Diffusion über die Placentaschranke in die wachsenden Keimschichten. In dieser frühen Phase ist das Großenverhältnis von Placenta zum Embryo >1, die placentare Durchblutung sehr groß. Der Beginn der Herzfunktion und die Ausbildung eines Kreislaufsystemes ist Folge der immer größer werdenden Diffusionsstrecken (16). Beim Schwein mißt der Embryo in diesem Stadium 5-8mm. Die ersten roten Blutzellen werden in den mesenchymalen Stammzellen des Dottersackes gebildet und übernehmen den Sauerstofftransport im Embryo. Die physiologischen Untersuchungen dieses Vorganges wurden 1977 von Bauer und Jelkmann an embryonalen Blutzellen des Kaninchens durchgefuhrt (49). Sie fanden, daß die O_2-Affinität im Laufe der intrauterinen Entwicklung signifikant ansteigt. Diesem Anstieg geht die Abnahme von 2,3-DPG parallel (Abb.6). Bei 14 Tage alten Embryonen (Übergang zur fetalen Phase) ist der $P_{50}O_2$-Wert des Hämoglobins mit 39mb fast so niedrig wie beim adulten Organismus mit 40mb. Die Megaloblasten können dennoch vom mütterlichen Kreislauf Sauerstoff aufnehmen, weil in diesem frühen Stadium der Ontogenese aus oben genannten Gründen keine hypoxischen Bedingungen vorliegen. Dazu kommt, daß das embryonale Gewebe sehr viel Sauerstoff

benötigt, und so die O_2-Abgabe bei relativ kleinen Partialdrucken erfolgen kann.

Abbildung 6



Änderung des $P_{50}O_2$ und Summe der löslichen Phosphate aus roten Blutzellen des Kaninchens im embryonalen und fetalen Stadium. Die Werte für das adulte Tier sind zum Vergleich wiedergegeben.

(Aus Jelkmann 49)

Erst im Fetalstadium reicht die intensive Durchblutung der Placenta alleine nicht mehr für den O_2-Übertritt aus. Der Organismus stellt für diese nun hypoxischen Verhältnisse entweder, wie beim Menschen, ein eigenes fetales Hämoglobin mit einer höheren Affinität zur Verfügung (genetische Kontrolle), oder drosselt die Synthese von 2,3-DPG (allosterische Kontrolle). Der letztere Mechanismus liegt unter anderem beim Kaninchen und Schwein vor (30).

20.2 Die Expression der Hamoglobine

Während der Ontogenese werden beim Schwein fünf Hämoglobine exprimiert. Davon stehen vier Komponenten für die embryonale Phase zur Verfugung. Diese heterotetrameren Komponenten setzen sich aus den vier Globin-Ketten α, ζ, ε und γ zusammen.

GowerI = ζ_2/ε_2 HeideI = ζ_2/α_2

GowerII = α_2/ε_2 HeideII = α_2/α_2

Ihre präparative Trennung und elektrophoretische Identifizierung ist in Abschnitt 13 auf Seite 41 beschrieben (47).

Die Vielfalt der embryonalen Hämoglobine wurde an allen bisher untersuchten Vertebraten gefunden. Dabei laßt sich allgemein feststellen, daß zwei Typen von Komponenten vorkommen (41). Der homogene Typ setzt sich aus nur embryonalen Ketten zusammen, es sind das GowerI und HeideI. Der heterogene Typ wird aus den adulten α-Ketten und den embryonalen ß-Typ Ketten gebildet: GowerII und HeideII. Die Komponenten werden in Bezug auf die Sauerstoffaffinitat getrennt behandelt (Abschnitt 20.2.2). Die Quantifizierung der Komponententrennungen an DEAE-Sephacel zeigt, daß bei Embryonen mit einer KS von 12-20mm der homogene Typ mit ca. 70%, der heterogene Typ mit 30% vorliegt. HbA ist in diesem Stadium noch nicht nachweisbar. Es ist anzunehmen, daß die ersten überhaupt gebildeten Hämoglobine ausschließlich vom homogenen Typ sind. Mit zunehmenden Gestationsalter geht der Anteil an embryonalen Hamoglobinen zuruck, und bei einer KS von 35mm liegen bereits über 50% HbA vor. Die Synthese verlagert sich sukzessiv von Dottersack in Milz und Leber, später und 'post partem' ist ausschließlich das rote Knochenmark dafür zuständig (16). Die Korellation von Bildungsstatte und Komponententyp konnte noch nicht gefunden werden (39).

Die chromatographischen Daten belegen zusatzlich eindeutig, daß im Laufe der Ontogenese beim Schwein keine anderen Globinketten, wie z.B. die γ- und δ-Ketten beim Menschen

exprimiert werden. Das schließt nicht aus, daß die Strukturgene für solche Ketten vorhanden sind. In fast allen bisher bekannten Globin-Genomen wurden Pseudogene gefunden, die aus einer Gen-Duplikation hervorgegangen sind (54). Sie waren möglicherweise früher aktiv, bis durch eine Nonsens Mutation ihre Expression gestoppt wurde. Auf diesen Punkt wird im Abschnitt 20.3.1 nochmals eingegangen.

20.2.1 Die O_2-Affinitäten des embryonalen Blutes

Die atmungsphysiologischen Messungen von Jelkmann & Bauer wurden an Megaloblasten und Gesamthämolysat, d.h. gemischten Komponenten aus embryonalen Kaninchen durchgeführt (49). Ihre Sauerstoffaffinität ist ebenso wie die des Hämoglobins im adulten Organismus durch Phosphate beeinflußbar. Unter physiologischen Phosphat-Werten (Hb<DPG) sind die O_2-Affinitäten von embryonalen und adultem Blut nahezu gleich. Deionisiertes HbE (stripped HbE) hat eine höhere intrinsische Affinität als HbA ($P_{50}O_2$ für HbE = 11mb, HbA = 23mb). Durch Zugabe von physiologischen Mengen Phosphat läßt sich jedoch beim HbE nicht mehr der niedrige $P_{50}O_2$-Wert des Vollblutes erreichen. Jelkmann diskutiert einen zusätzlichen Effektor, eventuell einen phosphorylierten Zucker, der sich unter anderen organischen Phosphaten nur schwer bestimmen läßt. Sicher ist aber der niedrige pH Wert von 6.8 in Megaloblasten und seine Auswirkung auf den Bohr-Effekt von großer Bedeutung.

20.2.2 Die intrinsischen Affinitäten der embryonalen Komponenten

Die Gegenüberstellung der funktionellen Aminosäuren der HbE mit dem HbA des Schweines (Menschen) zeigt die folgende Tabelle. Die Zusammenstellung der funktionellen Reste wurde aus dem "Atlas of Molecular Struktures in Biology" (61) ubernommen.

Aminosäuren in Klammern geben die zum HbA des Schweines entsprechenden Positionen beim Menschen an. Da alle funktionellen Reste der γ- und ε-Ketten gleich sind, wurden die Verhältnisse für GowerI und GowerII dargestellt.

$\zeta 1$ - $\varepsilon 2$, $\gamma 2$ Bindungsstellen im Desoxy-Hämoglobin

POS.		ζ	α	β	ε		POS.
37	C2	Pro			His	HC3	146
38	C3	Gln	<- Thr		Tyr	HC2	145
40	C5	Lys			Leu	G7	105
41	C6	Thr			Asn	G4	102
42	C7	Tyr			Glu	G3	101
44	CD2	Pro			Pro	G2	100
88	F9	Ala			Asp	G1	99
91	FG3	Leu			Val	FG5	98
92	FG4	Arg			His	FG4	97
94	G1	Asp		Glu ->	Asp	CD2	43
95	G2	Pro			Phe	C7	41
96	G3	Val			Arg	C6	40
97	G4	Asn			Trp	C3	37
140	HC2	Tyr			Pro	C2	36
141	HC3	Arg			Tyr	C1	35
					Val	B16	34

ζ1 - ε1, 𝒴1 Bindungsstellen im Desoxy-Hämoglobin

POS.	ζ	α	β	c	POS.
31	B12 Arg			Gln H9	131
34	B15 Ala	<- Leu		Ala H6	128
35	B16 Ser	<- Gly(Ser)		Gln H5	127
36	C1 Tyr	<- Phe	(Pro)Asp ->	Glu H3	125
103	G11 His			Pro H2	124
106	G13 Leu		(Phe)Asn ->	Thr H1	123
107	G14 Val			Phe GH5	122
110	G17 Ala			Gly GH2	119
111	G18 Ser	<- Ala	(His)Arg ->	Ser G18	116
114	GH2 Pro			Ala G17	115
117	GH5 Leu	<- Phe	(Cys)Val ->	Ile G14	112
118	H1 Thr	<- Asn(Thr)		Asn G10	108
119	H2 Ala	<- Pro		Met D6	55
122	H5 His			Tyr C1	35
123	H6 Ala			Val B16	34
126	H9 Asp			Val B15	33
				Arg B12	30

Ham-Kontakte der ζ- ε- und 𝒴-Ketten

POS.	ζ	α	β	c	POS.
42	C7 Tyr			Phe C7	41
43	CD1 Phe			Phe CD1	42
45	CD3 His			Ser CD3	44
46	CD4 Phe			Phe CD4	45
58	E7 His			His E7	63
61	E10 Lys			Lys E10	66
62	E11 Val			Val E11	67
65	E14 Ala		(Ala)->	Ser E14	70
66	E15 Val	<- Leu		Phe E15	71
80	F1 Leu			Phe F1	85
83	F4 Leu			Leu F4	88
86	F7 Leu			Leu F7	91
87	F8 His			His F8	92
91	FG3 Leu			Leu FG3	96
93	FG5 Val			Val FG5	98
97	G4 Asn			Asn G4	102
98	G5 Phe			Phe G5	103
101	G8 Leu			Leu G8	106
132	H15 Val			Val H15	137
136	H19 Leu			Leu H19	141

a) Für die embryonalen Hämoglobine vom heterogenen Typ (GowerII und HeideII) läßt sich aus den veränderten Resten keine zwingende Änderung der intrinsischen Affinität

ableiten. Die $\alpha 1$-$\beta 2$ Bindungsstellen sind bis auf βCD2(43) Glu->Asp gleich geblieben. Der $\alpha 1$-$\beta 1$ Berührungsbereich weist für die α-Ketten 2 Austausche zum Menschen auf. Für die β-Typ Ketten finden sich 4 Austausche zu den β-Ketten, die gleichen Reste sind auch zu denen des Menschen verschieden. In Position βH3(125) wird an Stelle von Pro (Human) beim adulten Schwein Asp, beim Embryo Glu gefunden. Dieser Aminosäurerest zeigt in den hydrophilen Bereich und dürfte nur wenig Einfluß haben. Bei βG18 wird für die polaren Reste Arg bzw. His (Human) die neutrale Gruppe Ser eingeführt. Dadurch geht eine H-Brücke verloren, die Fixierung der interhelicalen Region GH2-GH5 der α-Ketten ist geschwächt. Alle anderen Austausche sind von neutraler Natur.

b) Die embryonalen Komponenten vom homogenen Typ (GowerI und HeideI) unterscheiden sich von den oben beschriebenen im Ersatz der α-Ketten durch die ζ-Ketten. Für die postulierte, erhohte intrinsische Affinität scheint der Austausch αC3(38) Thr->Gln von Bedeutung zu sein (26). Bei allen bisher beschriebenen embryonalen Hamoglobinen ist diese Seitenkette identisch. Auch in den α-Ketten der Fische wird in αC3(38) ein Gln gefunden (67). Diese Aminosäure liegt im $\zeta 1$-$\varepsilon 2$ Bindungsbereich und erleichtert moglicherweise den Übergang von der T zur R-Struktur wahrend der Oxigenierung.

Bei den $\zeta 1$-$\varepsilon 1$ Bindungsstellen werden in den ζ-Ketten 7 veranderte Reste zu den α-Ketten des Schweines und 5 zu denen des Menschen gefunden. Die ausgetauschten Aminosauren sind jedoch konservativ, so daß daraus kein eindeutiger Einfluß auf die intrinsische Affinität abgeleitet werden kann. Es ist aber wahrscheinlich, daß ein summativer Effekt

aller veränderten Reste auf die Gesamtfunktion vorliegt. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die intrinsische Affinität der embryonalen Hämoglobine vom heterogenen Typ kaum, die vom homogenen Typ aber im Vergleich zum adulten Hämoglobin deutlich zu höherer Affinität verschoben sein wird.

20.2.3 Die Wechselwirkung mit Poly-Phosphaten, CO_2 und Protonen

Die Sauerstoffabgabe des Hämoglobins wird stark durch seine Wechselwirkung mit organischen Phosphaten, CO_2 und Protonen beeinflußt. Im folgenden sind die Effekte von 2,3-DPG, CO_2 und Protonen kurz erläutert.

a) Der Einfluß der organischen Phosphate und insbesondere die des 2,3-DPG wurde gleichzeitig von Benesch und Chanutin 1967 beschrieben (63,64)). Im adulten Organismus schiebt sich dieses Polyanion bei der Sauerstoffabgabe in eine durch positive Ladungen gekennzeichnete Spalte zwischen den β-Ketten. Dadurch wird die Desoxy-Form stabilisiert (T-Struktur) und in Folge der $P_{50}O_2$-Wert um 10mb gesenkt. Dieses quasi "verriegelte" Molekül kann bei den venösen O_2-Drücken von ca. 30mb keinen Sauerstoff mehr aufnehmen. Erst bei der Oxigenierung in der Lunge (hoher O_2-Partialdruck) wird das 2,3-DPG wieder verdrängt (42). Die Verhältnisse verkomplizieren sich durch Kohlendioxid und Protonen, die zusätzliche Effekte ausüben.

b) Die Abnahme der O_2-Affinität mit steigender Protonenkonzentration ist als Bohr-Effekt bekannt (43). Dabei sind die positiv geladenen, schwachen Basen mit einem pK-Wert im

physiologischen pH-Bereich von Bedeutung, sowie negativ geladene Gruppen in der Desoxy-Form des Hämoglobins (44). Bei pH 7 sind die schwachen Basen positiv geladen und bilden mit den negativen Gruppen Salzbrücken. Dadurch wird die Desoxy-Form stabilisiert und eine Erniedrigung der Affinität folgt. Durch die Salzbindung wird der pK-Wert der daran beteiligten Gruppen, und damit die Nettoladung verändert. Der direkte Zusammenhang zwischen Anderung der Sauerstoffaffinität und der Ladung mit dem pH-Wert wird durch die Gleichung

$$\Delta \log P_{50} O_2 / \Delta pH = \Delta H^+$$

ausgedrückt (Wyman 1964). Kilmartin hat nach Blockierung der N-Termini mit Cyanat und anschließenden Affinitätsmessungen gefunden, daß die N-Termini der α-Ketten zu 20% am Bohr-Effekt beteiligt sind, die der β-Ketten jedoch nicht (43). Durch Vergleich der NMR Spektren der Desoxy- und Carboxy-Form, von nativem Hb und solchem, aus dessen β-Ketten das C-terminale His enzymatisch entfernt wurde, konnte die Änderung des pK-Wertes dieser Imidazol-Gruppe in Abhängigkeit der Oxigenierung bestimmt werden. Er liegt in der Desoxy-Form bei pH 8.0, in der Carboxy-Form bei pH 7.1. Daraus wurde errechnet, daß βH21(143) His ca. 40% zum Bohr-Effekt beitragt. Es bildet zu βFG1(94) Asp oder βF6(90) Glu eine Salzbrücke. Gleichzeitig geht der N-Terminus der β-Ketten mit αC5(40) Lys eine Bindung ein, welche die T-Struktur stabilisiert (auch bei Hb's, die keinen Bohr-Effekt aufweisen). Für Hb-Portland konnte Tuchinda 1975 zeigen, daß der Bohr-Effekt nur etwa halb so groß ist (66). Hier liegen bekanntlich auch wie in dem HbE vom homogenen

Typ acetylierte ζ-Ketten vor (25).

c) Kohlendioxid bildet mit den N-Termini in der Desoxy-Form Carbamat (43). Der N-Terminus der β-Ketten liegt in einer Molekültasche in nächster Nähe zu einer positiven Gruppe: Als Carbamat bildet er eine Salzbrücke mit der ε-Aminogruppe von βEF6(82) Lys (Dieser Rest ist auch an der 2,3-DPG-Bindung beteiligt). Die T-Struktur wird dadurch stabilisiert, die Affinität verringert. Der N-Terminus der α-Ketten bildet nach Arnone (42) eine schwache Salzbrücke über ein Cl^- Ion mit der Guanidino-Gruppe vom C-terminalen Arg der anderen α-Kette. Durch die Carbamylierung wird das Cl^- verdrängt und die Bindung zum Arg verstärkt. Bei der Oxigenierung und CO_2-Abgabe wird diese Bindung wieder gebrochen. Die β-Ketten haben nach Perella (65) eine dreifach höhere Affinität zu CO_2 als die α-Ketten.

Bohr-Effekt, CO_2 und 2,3-DPG Bindung überlagern sich gegenseitig. Im pH Bereich unter 7 ist die Carbamatbildung schwach, weil der N-Terminus zum großten Teil protoniert vorliegt; der Bohr-Effekt dagegen ist kaum beeinflußt. Das ungebundene CO_2 erniedrigt zudem durch Bildung von Kohlensäure via Carboanhydrase den pH-Wert. Auf der anderen Seite (pH>7) ist der Bohr-Effekt praktisch aufgehoben, weil durch die carbamylierten N-Termini keine Protonen mehr aufgenommen werden können, und der pK-Wert des βHC3(146) His erreicht wurde. Diese Verhältnisse müssen von ausschlaggebender Bedeutung fur die Sauerstoffabgabe an das embryonale Gewebe sein.

Bei den embryonalen β-Typ Ketten sind alle Bindungsstellen für das 2,3-DPG vorhanden. Der Bohr-Effekt, sowie die CO_2-

Bindung sind nach den Strukturdaten nicht betroffen. So durfte die Komponente vom heterogenen Typ in ähnlicher Weise wie das HbA diesen Regulationsmechanismen unterworfen sein. Doch sollte der niedrige pH-Wert von 6.8 in den Megaloblasten über den Bohr-Effekt (Stabilisierung der T-Struktur durch Protonenaufnahme) zusätzlich die Abgabe des Sauerstoffes in das embryonale Gewebe erleichtern.
Der acetylierte N-Terminus der ζ-Ketten wird die Sauerstoffabgabe bedeutend beeinflussen. Der Bohr-Effekt, sowie die Carbamatbildung sind beeinträchtigt. Die folgenden Betrachtungen der embryonalen Atmung sind noch spekulativ und sollen später durch physiologische Messungen an den gereinigten Komponenten erstmals experimentell untersucht werden.

20.3 Die Atmung des Embryos

Nach den bisherigen Ausführungen läßt sich die Atmung des Embryos wie folgt beschreiben. Die O_2-Partialdruck-Bedingungen sind durch das multivillöse Strombahnsystem des Embryo-Placenta Komplexes nicht als hypoxisch zu bezeichnen. Die Diffusionsverhältnisse (Dicke der Keimschichten, Diffusionsstrecken, Erythrozytenoberfläche und deren Hb Gehalt) sind gunstig. Die Hämoglobine vom homogenen Typ übernehmen in der Anfangsphase alleine den O_2-Transport. Sie sind durch eine hohe intrinsiche Affinität ausgezeichnet und beim venosen O_2-Partialdruck von 28mb zu ca 80% gesättigt. Die Affinitätskurve verläuft im mittleren Bereich relativ steil, der Hill-Koeffizient ist kleiner als 3. Für den frühen Embryo würde das bedeuten, daß bei sehr kleinen

Druckschwankungen viel Sauerstoff abgegeben werden kann, und der Anteil des restlich gebundenen Sauerstoffes minimal wird. Mit dem Auftreten der HbE vom heterogenen Typ wird zusatzlich Hämoglobin mit anderen Eigenschaften bereitgestellt. Diese Komponente unterliegt in größerem Maß den regulativen Effekten von Protonen und CO_2 . Sie stellt quasi eine Reserve für Gewebe mit geringerem O_2-Verbrauch dar, d.h. bei sehr kleinen Partialdrücken kann sie relativ mehr O_2 abgeben als die frühe Komponente, die den regulativen Effekten weniger stark unterworfen ist.
Mit zunehmendem Gestationsalter werden die Versorgungsansprüche größer, das Angebot des Sauerstoffes kann nicht mithalten. Für den Fötus entstehen nun hypoxische Verhältnisse. Die Atmung wird dann, wie bereits beschrieben, allosterisch oder genetisch kontrolliert (30).

20.4 Phylogenetische Aspekte der embryonalen Hämoglobine

20.4.1 Die Evolution aus funktioneller Sicht

Das Problem der Affinitätsänderung des Hämoglobins zum Sauerstoff wurde im Laufe der Artenentstehung in verschiedener Weise gelöst (67,68,63,64). Die heterotropen Effektoren sind organische Phosphate bei Fischen (ATP, GTP), Vögeln (Inosin-penta-Phosphat) und Säugern (2,3-DPG). Bei letzteren wiederum gibt es welche mit hoher und niedrigerer intrinsischer Affinität, einer Eigenschaft, die in etwa mit der Körpergröße und auch mit der ökologischen Verbreitung (Tauchen, Höhlenleben) einhergeht (34). Eine Besonderheit liegt bei Krokodilen vor: Sie benützen das Stoffwechselpro-

dukt CO_2 in Form von Hydrogencarbonat zur Senkung der O_2-Affinität (50). Allen Effektoren ist die Salzbindung zu ßEF6(82) Lys eigen. Durch die planare Struktur von HCO_3 (Phosphate sind tetraedrisch) ist die H-Brücke zu ßH21(143) Arg aus sterischen Gründen nicht mehr möglich, sie wird zu ßH22(144) Glu gebildet. Der Einfluß auf die Quartarstruktur ist jedoch der gleiche wie bei den Phosphaten: Stabilisierung der T-Struktur und erhöhte Sauerstoffbereitstellung. Die Abb.7 faßt diese Daten zusammen.

Abbildung 7

	NA1	NA2	EF6	H13	H17	H21	H22	
Effektor	ß1	ß2	ß82	ß135	ß139	ß143	ß144	Kontakte
2,3-DPG	Val	His	Lys	-	-	His	-	7
Ins-P_5	Val	His	Lys	Arg	His	Arg	-	10
ATP,GTP	-	Glu	Lys	-	-	Arg	-	5
HCO_3^-	Ac-Ala	-	Lys	-	-	-	Glu	6

Die allosterische Kontrolle bei Krokodilen mit Kohlensaure ist sinnvoll und ökonomisch. Ein Endprodukt des Stoffwechsels wird verwendet, um die O_2-Abgabe an das Gewebe zu erleichtern. Es sind dazu keine zusätzlichen Enzyme nötig, wie die Phosphoglycerat-Mutase und 2,3-DPG Phosphatase im Rapoport-Lybering-Zyklus. Obwohl einfach, scheint sonst keine Tierklasse diese Losung gefunden zu haben. Interessanterweise liegen die ß-Ketten acetyliert vor, eine Struktur, die auch die embryonalen ζ-Ketten auszeichnet. Diese α-Typ Ketten aber haben fur die allosterische Regulation nur wenig

Bedeutung.

20.4.2 Entstehung der embryonalen Globin Ketten

In der folgenden Abbildung 8 und 9 sind die bisher sequenzierten embryonalen Ketten mit einigen adulten Ketten verglichen. Nur die unterschiedlichen Reste zu den α- und β-Ketten des Menschen sind wiedergegeben, die davon allen embryonalen Ketten gemeinsamen Reste sind eingerahmt. Der Vergleich wurde mit einem Alignment Programm unter zu Grunde Legung der "genetic code matrix" durchgeführt (60). Die Abkürzungen stehen für folgende Globinketten, wobei die beiden ersten Buchstaben das Protein, die nächsten beiden die Art und eventuell folgende eine weitere Spezifikation darstellen.

HAHU	= Hamoglobin	α-Ketten	Mensch		
HBHU	= "	β "	"		
HZHU	= "	ζ "	"	Embryo	
HAPG	= "	α "	Schwein		
HBPG	= "	β "	"		
HZPG	= "	ζ "	"	Embryo	
HACH1	= "	αA "	Huhn		
HACH2	= "	αD "	"		
HBCH	= "	β "	"		
HACHPE	= "	α "	"	Embryo	
HGHUA	= "	γA "	Mensch	Fetus	
HEHU	= "	ε "	"	Embryo	
HTPG	= "	? "	Schwein	Embryo	
HFCHR	= "	rho "	Huhn	Fetus	
HEMSY2	= "	Y2 "	Maus	Embryo	
HBRB3	= "	β3 "	Kaninchen	Embryo	

Abbildung 8

Homologer Vergleich der embryonalen α-Typ-Ketten von Mensch, Schwein und Huhn. Nur die zur Sequenz des Menschen veränderten Reste wurden wiedergegeben.

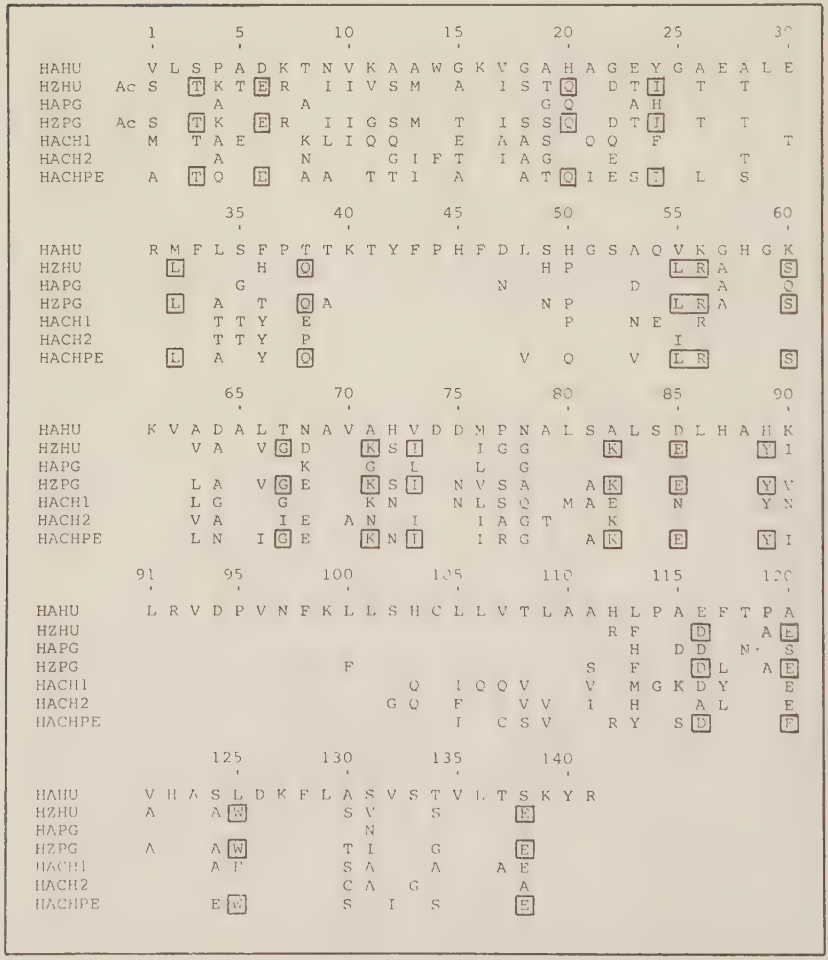


Abbildung 9

Homologer Vergleich aller bisher bekannten embryonalen β-Typ-Ketten. Die Abkürzungen sind auf S.87 erleutert.

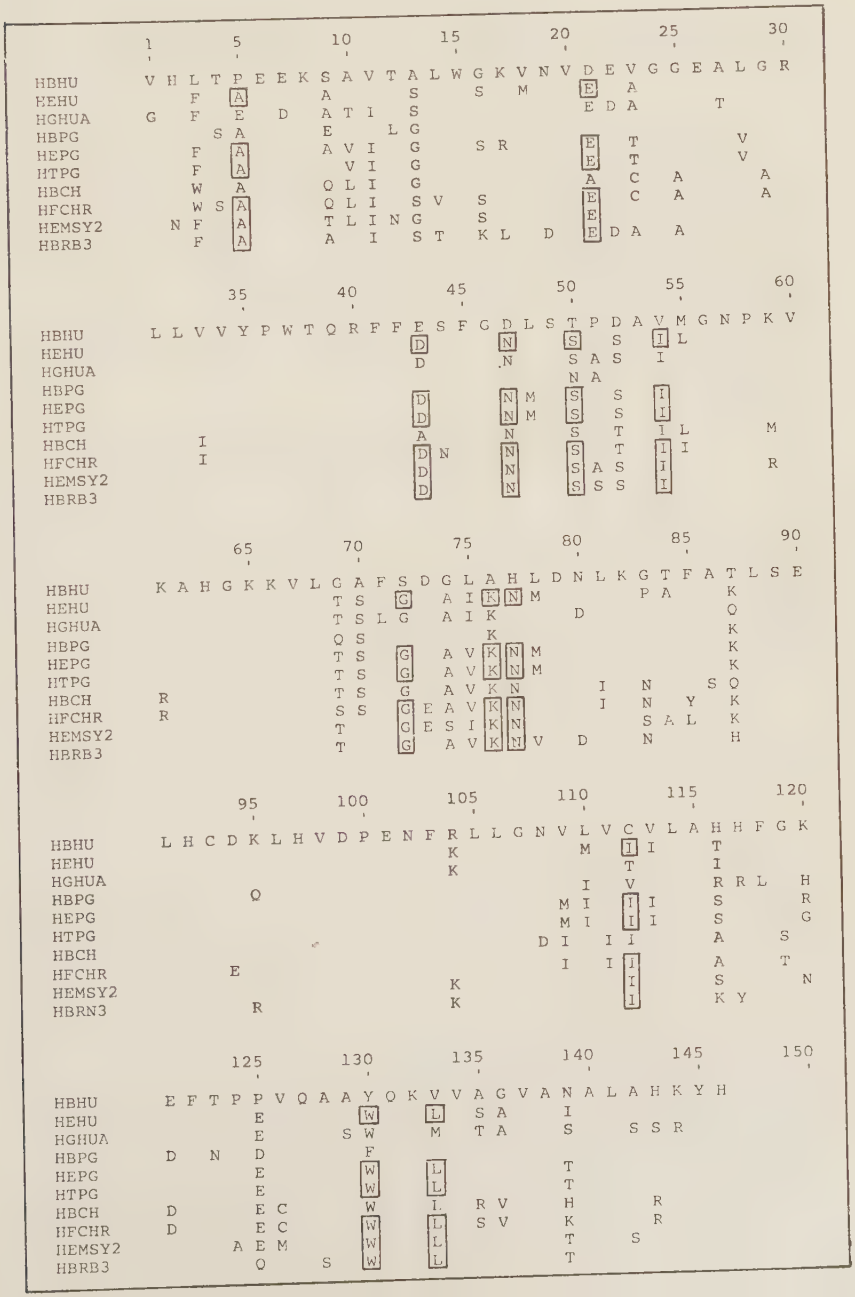


Tabelle VIII

Aminosäuren und minimale Nucleotidaustausche zwischen verschiedenen Hamoglobin Ketten von α- und β-Typ. Über der Diagonalen die Aminosäuren, unter der Diagonalen die Nucleotide.

1.) die α-Typ Ketten

	HAHU	HZHU	HAPG	HZPG	HACH1	HACH2	HACHPE
HAHU	0	57	22	62	59	42	60
HZHU	75	0	59	23	65	62	42
HAPG	23	79	0	65	64	47	61
HZPG	83	25	85	0	62	64	50
HACH1	76	88	87	89	0	61	60
HACH2	53	77	60	80	80	0	60
HACHPE	79	51	80	57	85	78	0

2.) die β-Typ Ketten

	HBHU	HGHUA	HBPG	HEHU	HEPG	HTPG	HFCHR	HEMSY2	HBRB3
HBHU	0	40	22	36	36	33	49	39	39
HGHUA	50	0	46	29	34	33	47	35	32
HBPG	29	53	0	41	38	36	51	42	45
HEHU	44	31	47	0	20	21	36	27	27
HEPG	44	36	43	21	0	4	37	26	27
HTPG	42	36	43	23	4	0	37	26	28
HFCHR	61	56	62	43	43	44	0	40	41
HEMSY2	47	37	48	28	28	28	47	0	32
HBRB3	50	37	57	32	32	35	52	38	0

Die vergleichende Gegenüberstellung und die Austauschtabelle (Tabelle VIII) läßt folgendes sofort erkennen: Die embryonalen Globine sind untereinander ähnlicher als die embryonalen und adulten der gleichen Art. Die beiden ζ-Ketten von Mensch und Schwein differieren in nur 23 Positionen, während sich die α- und ζ-Ketten beim Menschen in 57, beim Schwein sogar in 65 Positionen unterscheiden. Für die Ketten vom β-Typ ist der Unterschied nicht so groß: Zwischen den ε-Ketten sind 20 Reste verandert, bei dem Paar ε/β Mensch 36 und bei ε/β Schwein 38 Reste. Diese Beobachtungen zeigen, daß das ζ-Gen schon sehr fruh entstanden sein muß, wahrscheinlich kurz nach der Duplikation eines Urglobin Gens

vor ca. 400ma, aus der die α- und β-Ketten hervorgegangen sind.

Die Abzweigung der embryonalen β-Typ Ketten von den β-Ketten ist nicht so alt. Sie fand vor ca. 100ma statt, zur Zeit der ersten Säugetiere. Vielleicht war unter anderem auch dieses Ereignis Voraussetzung für die verlangerte Entwicklungsphase der Säuger im Uterus. Interessant ist in diesem Zusammenhang die tertiäre Struktur des Hämoglobins, also seine 'Komposition' aus zwei Kettentypen. Die ζ-Ketten wurden bisher nur in Verbindung mit den embryonalen β-Typ und den γ-Ketten gefunden, nicht aber zusammen mit den β-Ketten. So müßte die evolutionäre Anpassung dieser Ketten 300ma gedauert haben, um schließlich als embryonales Hamoglobin eine stabile Form zu finden.

Stellt man den Vergleich mit der Fragestellung nach der Evolutionsgeschwindigkeit an, so entsprechen sich die Austausche zwischen den embryonalen und adulten Ketten von Schwein und Mensch.

HAHU/HAPG = 22 HBHU/HBPG = 22 HEHU/HTPG = 21

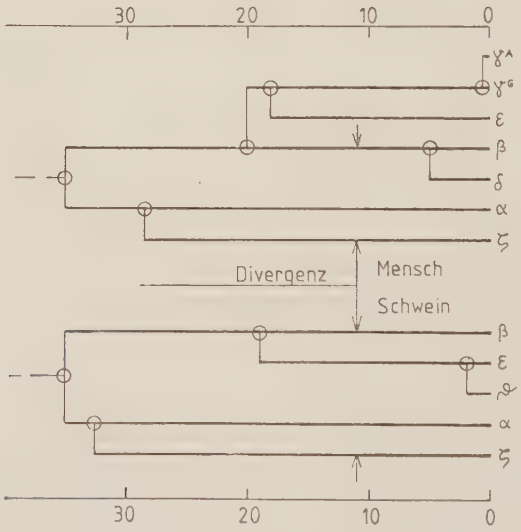
HZHU/HZPG = 23 HEHU/HEPG = 20

Im Mittel finden sich also 22 Unterschiede in allen Ketten. Dieser Wert spricht für die gleiche Mutationsrate von diesen verschiedenen Kettentypen. Nach der Berechnung von Wilson (35) wäre ein gemeinsamer Vorfahre vor ca. 50ma zu suchen. Die γ-Ketten unterscheiden sich nur in vier Sequenzen von den ε-Ketten. Die Divergenz dürfte vor erst 10-20ma erfolgt sein, so daß das entsprechende Gen nur in der Familie der Schweine zu finden sein wird. Die Abb.10 zeigt die Stammbäume aller exprimierten Hamoglobinketten von Schwein

und Mensch.

Das menschliche Globin-Genom wurde vor kurzem in allen Details beschrieben Abb.11 (51,53). Neben den exprimierten Strukturgenen wurden Pseudogene gefunden (54). Ihre Entstehung und Funktion ist unbekannt. Vielleicht stellen sie ein sich stark änderndes Reservoir dar, aus dem sich die Natur bei Bedarf passende Strukturen hervorholt. Beim Schwein wurden keine γ-Ketten gefunden, obwohl die Abspaltung dieses Gens vor der Divergenz von Schwein und Mensch erfolgt ist.

Abbildung 10

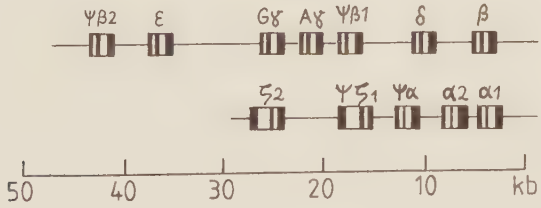


Die Globin Stammbaume aller exprimierten Ketten von Mensch und Schwein sind dargestellt. Die Skala gibt die Zahl der Amminosaurenaustausche zwischen den Proteinen wieder. Kreise bedeuten Gen Duplikation. Bei einer Zeitskala wären die Abzweigungen für ε- und auch für die ζ-Ketten in gleicher Höhe.

Moglicherweise liegt das γ-Gen beim Schwein als Pseudogen

vor. Hier wäre zu prüfen, ob solche Strukturen konserviert werden, oder im Laufe der Evolution verschwinden. Die Organismen durchlaufen während ihrer Ontogenese in kurzen Zügen quasi die ihnen eigene Geschichte. Alte, bewährte Strukturen kommen kurz zur Expression, bis sie durch immer jüngere Errungenschaften ersetzt werden. Interessant ist auch unter diesem Gesichtspunkt, daß die Reihenfolge auf dem Genom die zeitliche Entwicklung widerspiegelt. So liegen die Strukturgene beim Menschen für die embryonalen Ketten am äußersten 5' Ende, die der adulten Ketten am 3' Ende und die für die fetalen γ-Ketten codierenden dazwischen.

Abbildung 11



Die Organisation des menschlichen Globin-Genes. Die β-Gene liegen auf Chromosom 11, die α-Gene auf Chromosom 16 (55,56). Pseudogene sind mit Ψ bezeichnet. Die Distanzen der Gene sind in Kilobasen angegeben. (aus Progress in Hematology Bd.XII (52)).

Diese Beobachtungen lassen die alte Haeckel'sche biogenetische Regel in neuem Licht erscheinen und eine verblüffend einfache strukturelle Interpretation zu. Haeckel unterschied zwischen phylogenetisch interpretierbaren Phasen, der Palingenese, und veränderten, gestörten Embryo-

nalphasen, der Caenogenese (69). Mit letzterem ist gemeint, daß Entwicklungsstufen während der Ontogenese übersprungen werden, oder nur verwaschen auszumachen sind. Das Globingenom mit seinen embryonalen, fetalen, adulten und insbesondere den Pseudogene ist dafür ein Paradebeispiel.

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

In der vorliegenden Arbeit wurden die Primärstrukturen vom adulten Hämoglobin des Bisams (Ondatra zibetica) und den embryonalen Hamoglobinen des Hausschweines (Sus scrofa domestica embryonalis) beschrieben und in Bezug auf Atmung und Paläontologie diskutiert.

1.) Das Hämoglobin des Bisams.

Die Elektrophoresen und die chromatographischen Analysen zeigen, daß der Blutfarbstoff des Bisams aus nur einer Komponente besteht. Die Trennung der Ketten gelang an CM-Cellulose im Natrium-Acetat-System bei pH 5.0. Die Sequenz der α-Ketten wurde ausschließlich an Hand der tryptischen Peptide erarbeitet, bei den β-Ketten war zusätzlich die Isolierung des Pro-Peptides an CM-Cellulose nötig, um die Positionen 100-120 zu sequenzieren. Das tryptische Hydrolysat wurde nach Ausfällung des "cores" bei pH 6.5 an Sephadex G25f vorfraktioniert. Die Reinigung der Peptide erfolgte bei den α-Ketten am Ionenaustauscher Dowex 50Wx4, bei den β-Ketten wurde dazu auch die HPLC mit RP8 als Säulenmaterial eingesetzt. Die isolierten Fragmente wurden mit Hilfe der DC-Elektrophorese auf Einheitlichkeit überprüft und durch Aminosäurenanalyse identifiziert. Durch Vergleich mit der Sequenz des menschlichen Hämoglobins konnten die Peptide eindeutig zugeordnet werden. Die Sequenzierung des N-terminalen Bereiches der Ketten (42 Schritte), sowie der Peptide erfolgte durch automatischen Abbau nach Edman-Begg mit der Filmtechnik.

Bei homologen Gegenüberstellung der α-Ketten von Mensch und Bisam ergeben sich 22, bei den β-Ketten 36 Unterschiede in den Resten. Von den bisher sequenzierten Hämoglobinen aus der Ordnung der Nagetiere sind sich die von Bisam und Hamster am ähnlichsten: 12 Unterschiede in den α- und 19 in den β-Ketten.

In Bezug auf die Sauerstoffaffinität zeigt die Sequenz des Bisamhämoglobins keine Besonderheit. Die 2,3-DPG-Bindungsstellen, sowie die Bereiche der intermolekularen Wechselwirkung der Ketten bei der Oxigenierung, sind in der Gegenüberstellung mit Sequenz des Menschen gleich. Nur in den α1-β1-Bindungsstellen sind in jeder Kette 4 Reste verandert, die sich sterisch genau entsprechen. Sie sollten daher die intrinsische Affinitat des Hamoglobins kaum beeinflussen.

2.) Die embryonalen Hämoglobine des Schweines.

Nach der elektrophoretischen Analyse besteht der embryonale Blutfarbstoff des Schweines aus vier Komponenten, die sich ihrerseits aus vier Ketten zusammensetzen. Mit Hilfe der Säulenchromatographie an DEAE-Sephacel gelang die präparative Darstellung aller Komponenten. Sie werden nacheinander wie folgt von der Säule eluiert und in der denaturierenden Elektrophorese identifiziert: GowerII (α_2/ε_2), GowerI (ζ_2/ε_2), HeideII (α_2/γ_2), HeideI (ζ_2/γ_2). Die ersten exprimierten Hamoglobine sind GowerI und HeideI, sie sind vom homogenen Typ, d.h. daß sie nur aus embryonalen Ketten zusammengesetzt sind.

Die Ketten der Komponenten GowerI und HeideI wurden praparativ an CM-Cellulose im Phosphat-System pH 6.8 getrennt. Die Elution der Proteine erfolgte durch einen

parabolischen Natrium-Phosphat-Gradienten. Die Sequenzierung der ζ-Ketten wurde von Herrn Dr. H. Aschauer übernommen. Die Sequenzen der β-Typ Ketten (ε und ϑ) wurden ausschließlich an Hand der tryptischen Peptide erarbeitet. Der lösliche Anteil des tryptischen Hydrolysates wurde an Sephadex G25f vorfraktioniert und die Fragmente mit Hilfe der HPLC an RP8 und RP2 als Säulenmaterial im Kratzin'schen System isoliert. Der bei pH 6.2 unlösliche Teil des Hydrolystes wurde mit der HPLC an RP2 als Säulenmaterials im TFA System aufgearbeitet. Daraus ließen sich die schwer zu isolierenden Peptide Tp5 und Tp12 der ε-Ketten und Tp5 und Tp12+13 der ϑ-Ketten gewinnen. Die Identifizierung der Peptide erfolgte durch DC-Elektrophorese und Aminosaurenanalyse. Die N-terminalen Bereiche beider β-Typ Ketten waren über 30 Schritte durch Sequenzierung der Komoponenten GowerI und HeideI von Steer bestimmt worden. Die drei unterschiedlichen Reste im Tp2 der ε- und ϑ-Ketten wurden durch Analysen und Sequenzierung desselben bestätigt. Die vierte ausgetauschte Aminosäure zwischen den ε- und ϑ-Ketten ist der Rest εGH3(120) Arg->Gly; deshalb konnte bei den ϑ-Ketten kein Tp13 gefunden werden.

Während der Ontogenese werden beim Schwein funf Hamoglobine exprimiert, wovon vier dem Embryo zur Verfügung stehen. Einen fetalen Blutfarbstoff gibt es nicht. In der frühen embryonalen Phase übernehmen die Komponenten GowerI und HeideI den O_2-Transport. Auf grund der Strukturdaten wird eine veränderte O_2-Bindungskurve postuliert, die vor allem durch den acetylierten N-Terminus der ζ-Ketten bedingt ist: Bohr-Effekt und Carbamatbildung sind dadurch beintrachtigt.

Im α1-β2-Bindungsbereich ist in den ζ-Ketten ein Rest verändert: αC3(38) Thr->Gln. Diese Aminosäure wurde auch in Fischhämoglobinen nachgewiesen und könnte für die veränderte intrinsische Affinität von Bedeutung sein. Die 2,3-DPG-Bindungsstellen sind in den γ- und ε-Ketten vorhanden. Die Komponenten vom heterogenen Typ, GowerII (α_2/ε_2) und HeideII (α_2/γ_2), sollten wie HbA (α_2/β_2) den regulatorischen Effekten unterworfen sein.

Die embryonalen Globinketten verschiedener Spezies sind sich untereinander ähnlicher als die embryonalen und adulten der gleichen Art. Die ζ-Ketten haben ihren Ursprung in einer Duplikation des α-Gens vor ca. 350ma, die ε-Ketten entstanden durch Verdopplung des β-Gens vor ca. 100ma. Die homologen Ketten von Mensch und Schwein unterscheiden sich im Mittel in 22 Resten. Beim Schwein konnten keine γ-Ketten nachgewiesen werden, obwohl sich die Linie von Schwein und Mensch vor ca. 50ma verzweigte, die Duplikation des γ-Gens aber schon vor mehr als 100ma erfolgte. Zwischen ε- und γ-Ketten des Schweines wurden vier Sequenzunterschiede gefunden. Ihre Divergenz durfte erst vor ca. 10-20ma erfolgt sein, so daß das entsprechende Gen nur in der Familie der Schweine zu finden sein wird.

VI. L I T E R A T U R

(1) Davis, B.J. (1964) Ann.N.Y.Acad.Sci.121, 404-427. Disc Elektrophoresis-II. Method and Application of Human Serum Proteins.

(2) Alter, B.P., Goff,S.C., Efremov,G.D., Gravely,M.E., & Huisman, T.H.J. (1980) Br.J.Hematol. 44, 527-534. Globin Chain Elektrophoresis: a New Approach to the Determination of the Gγ/Aγ Ration in Fetal Haemoglobin and to Studies of Globin Sythesis.

(3) Schroeder, W.A. & Huisman T.H.J. (1980) Clincal and Biochemical Analysis, Marcel Dekker, Inc. The Chromatography of Hemoglobin.

(4) Rossi-Fanelli, A. & Antonini, E. (1958) Biochim. Biophys. Acta 30, 608-615. Studies on the Strukture of Hemoglobin

(5) Teale, F.W.J. (1959) Biochim. et Biophys. Acta 35, 543. Cleavage of haem-protein link by acid methylethylketone.

(6) Clegg, J.B., Naugthon, M.A. & Weatherall, D.J. (1968) Nature 219, 69-70. Separation of the α- and β-chains of human hemoglobin.

(7) Jauregui-Adell, J. & Marti,J. (1975) Anal.Biochem.69, 468-473. Acidic Cleavage of the Aspartyl-Proline Bond and the Limitations of the Reaction.

(8) Hilse, K. & Braunitzer, G. (1959) Z. Naturforschung 14b, 604-606.

(9) Kratzin, H., Yang, C., Krusche, J. & Hilschmann, N. (1980) Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 361, 1591-1598. Präparative Auftrennung des tryptischen Hydrolysates eines Proteins mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeitchromatographie. Die Primärstruktur einer monoklonalen L-Kette vom K-Typ, Subgruppe I (Bence-Jones-Protein Wes)

(10) Spackman, D.H., Stein, W.H. & Moore, S. (1958) Anal. Chem. 30, 1190-1206. Automatic Recording Apparatus for Use in the Chromatography of Amino Acids.

(11) Edman, P. & Begg, G. (1967) Eur. J. Biochem. 1, 80-91. A Protein Sequenator.

(12) Pfletschinger, J. & Braunitzer, G. (1980) Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 361, 925-931. Kovalente, C-terminale Hydrophilisierung von Bromcyanpeptiden mit Arginin im Sequenator.

(13) Zimmermann,C.L., & Pisano,J.J. (1977) Methods Enzymol. 47, 45-51. High-Performance Liquid Chromatography of Amino Acid Derivatives.

(14) Braunitzer, G., Schrank, B., Ruhfus, A. (1970) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1589-1590. Versuche zum vollständigen und automatischen Abbau von Peptiden nach der Quadrolmethode.

(15) Braunitzer, G., Schrank, B., Ruhfus, A., Petersen, S. & Petersen, U. (1971) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1730-1732. Zur vollständigen automatischen Sequenzanalyse von Peptiden mit Quadrol.

(16) Hamilton, W.J., Boyd, J.D., Mossman, H.W. (1976) London: Macmillan. Human Embryology.

(17) Braunitzer, G., Gehring-Müller, R., Hilschmann, N., Hilse, K., Hobom, G., Rudloff, V. & Wittmann-Liebold, B. (1961) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 325, 283-286. Die Konstitution des normalen adulten Human-hämoglobins.

(18) Drescher, H. & Künzer, W. (1954) Klin. Wochenschrift 32, 92. Der Blutfarbstoff des menschlichen Feten.

(19) Huehns, E.R., Flynn, F.V., Butler, E.A. & Beaven, G.H. (1961) Nature (London) 189, 496-497. Two New Haemoglobin Variants in a Very Young Human Embryo.

(20) Hecht, F., Motulsky, A.G., Lemire, R.J. & Shepard, T.E. (1966) Science 152, 91-92. Predominance of Hemoglobin Gower 1 in Early Human Embryonic Development.

(21) Gapp, G.L., Rigas, D.A. & Jones, R.T. (1967) Science 157, 65-66. Hemoglobin Portland 1: New Human Hemoglobin Unique in Structure.

(22) Baralle, F.E., Shoulders, C.C., and Proudfoot, N.J. (1980) Cell 21, 621-626. The Primary Structure of the Human ε-Globin Gene.

(23) Gale, R.E., Clegg, J.B., and Huehns, E.R. (1979) Nature 280, 162- 164. Human embryonic haemoglobins Gower 1 and Gower 2 (Partial sequence of residues 1-104 and 111-146 of the ε-chain).

(24) Aschauer, H., Sanguansermsri, T. & Braunitzer, G. (1981) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1159-1162. Embryonale Hämoglobine des Menschen: Die Primärstruktur der ζ-Ketten.

(25) Aschauer, H., Schäfer, W., Sanguansermsri, T. & Braunitzer, G. (1981) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1657-1659. Embryonale Hämoglobine des Menschen: Ac-Ser-Leu-Thr-, die N-terminale Sequenz der ζ-Ketten.

(26) Clegg, J.B. & Gagnon (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol.78, No. 10, 6076-6080. Structure of the ζ Chain of Human Embryonic Hemoglobin.

(27) Braunitzer, G., Schrank, B., Stangl, A. & Scheithauer, U. (1978) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 137-146. Hämoglobine, XXI. Die Sequenzanalyse des Hamoglobins des Schweines.

(28) Baumann, R., Teischel, F., Zoch, R. & Bartels, H. (1973) Resp. Physiol. 19, 153. Changes in red cell 2,3-Diphosphoglycerat concentration as cause of the postnatal decrease of pig blood oxigen affinity.

(29) Tweedale, P.M. (1973) Resp. Physiol. 19, 12. DPG and the oxigen affinity of maternal and foetal pig blood and haemoglobins.

(30) Braunitzer, G. (1979) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1237-1242. Hämoglobine XXVIII. Phosphat-Protein-Wechselwirkung, Genexpression und Funktion: Genetische und allosterische Kontrolle der Sauerstoffaffinität des foetalen Blutes.

(31) Garrick, L.M., Sharma, V.S., McDonald, M.J. & Ranney, H.M. (1975) Biochem. J. 149, 245-258. Rat Haemoglobin Heterogeneity.

(32) De Smet, H.O. (1978) Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia 70. 119-131. A Comparison of the elektrophoretic Haemoglobin Patterns of the Vertebrates.

(33) Kleinschmidt,T., Jelkmann, W., Braunitzer,G. (1981) Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 362, 1263-1272. Hämoglobine, XLIII Die Primärstruktur des Hämoglobins des Maulwurfs (Talpa europaea)

(34) Jelkmann, W., Oberthür, W., Kleinschmidt, T., Braunitzer, G. (1981) Resp. Physiol. 46, 7-16. Adaption of Hemoglobin Funktion to Subterranean Life in the Mole, Talpa europaea.

(35) Wilson, A.C., Carlson, S.S. & White, T.J. (1977) Annu. Rev. Biochem. 46, 573-639. Biochemical Evolution.

(36) Duffy,L.K., Genaux,C.T., Morrison,P.R. (1978) Comp. Biochem. Physiol., Vol. 61B, 521-532. Amino Acid Differences between Major and Minor Hemoglobins from Lemmings (Lemmus and Dicrostonyx)

(37) Genaux,C.T., Ernst K.U. & Morrison P.R. (1976) Biochem. Syst. Ecol. 4, 295-301. A Comparison of the Tryptic Peptides of Hemoglobin from Two Microtine Genera: Clethrionomys and Ondatra. (Rötelmaus und Bisam)

(38) Braunitzer, G. Schrank, B. Stangl, A. Wiesner, H. (1980) Chem. Soc. Pak., Vol. 2, No.1, 1-7. Hohenatmung, Phosphat-Protein-Wechselwirkung: Die Sequenz der Hämoglobine des Goldhamsters (Mesocricetus auratus) und des zweihockerigen Kamels (Trampeltier, Camelus ferus, Camelidae).

(39) Boussios, T., Bertles J.F., Clegg, J.B. (1982) Science, Vol. 218, 1225-1227. Simultaneous Expression of Globin Genes for Embryonic and Adult Hemoglobins During Mammalian Ontogeny.

(40) Flavin, M., Ton That, H., Deparis, P., Duprat, A.M. (1982) Wilhelm Roux's Archives 191, 185-190. Hemoglobin Switching in the Salamander Pleurodeles waltlii. Immunfourescence Detektion of larval and Adult Hemoglobins in Single Erythrocytes.

(41) Melderis H., Steinheider, G. & Ostertag, W. (1974) Nature (London) 250, 774-776. Evidence for a Unique Kind of α-Type Globin Chain in Early Mammalian Embryos.

(42) Arnone, A. (1972) Nature 237, 146-147. X-ray Diffraction Study of Binding of 2,3-Diphosphoglycerat fo Human Deoxyhemoglobin.

(43) Kilmartin, J. (1976) Br. Med. Bull. 32, 209-212. Interaction of Haemoglobin with Protons, CO_2 and 2,3-Diphosphoglycerate.

(44) Perutz, M. M. & Imai, K. (1980) J. Mol. Biol. 136, 183-191. Regulation of Oxygen Affinity of Mammalian Haemoglobins.

(45) Tautz, Ch. & Kleihauer, E. (1972) Res. exp. Med. 159, 44-49. Gibt es ein fetales Hämoglobin beim Schwein?

(46) Steer, W. & Braunitzer, G. (1980) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1165-1169. Hämoglobine, XXXIV. "Hämoglobin Heide", ein neues embryonales Hamoglobin N-terminale Sequenz der $\mathcal{E}$-Ketten.

(47) Bektas, M.S., Bieber, F.A., Braunitzer, G. (1981) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 991-995. Hemoglobins, XLI. The Embryonic Hemoglobins of Mammal: A new Hemoglobin, Hemoglobin HeideII, and Demonstration of Hemoglobin Structure of GowerI in the Pig Embryo.

(48) Kim, H.D. & Duhm, J. (1974) Am. J. Physl. 226, 1001-1006. Postnatal decrease in the oxygen affinity of pig blood induced by red cell 2,3-DPG.

(49) Jelkmann, W. & Bauer, Ch. (1977) Pflügers Arch. 372, 149-156. Oxigen Affinity and Phosphate Compounds of Red Blood Cells during Intrauterine Development of Rabbits.

(50) Perutz, M.F., Bauer, C., Gros, G., Leclercq, F., Vandecasserie, C., Schnek, A.G., Braunitzer, G. Friday, A.E. & Joysey, K.A. (1981) Nature 291, 682-684. Allosteric regulation of crocodilian haemoglobin.

(51) Proudfoot, N.J., Shander, M.H.M., Manley, J.L., Gefter, M.L., Maniatis, T. (1980) Science 209, 1329-1336. Structure of the Genes That Do Not Rearrange.

(52) Bank, A. Progress in Hematology XII (1981). Globin Gene Structure in Disorders of Hemoglobin.

(53) Barrie, P.A., Jeffreys, A.J. (1981) J. Mol. Biol. 149, 319-336. Evolution of the β-Globin Gene Cluster in Man and the Primates.

(54) Little, P.F.R. (1982) Cell 28, 683-684. Globin Pseudogenes (Minireview).

(55) Deisseroth, A., Nienhuis, A., Lawrence, J., Giles, R., Turner, P. Ruddle, F.H. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 1456-1460. Chromosomal localization of human β globin gene on human chromosom 11 in somatic cell hybrids.

(56) Deisseroth, A., Nienhuis, A., Turner, P., et al. (1977) Cell 12, 205-218. Localization of the human α globin structural gene to chromosome 16 in somatic cell hybrides by molecular hybridization assay.

(57) Oberthür, W., Braunitzer, G., Baumann, R. & Wright, P.G. (1983) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 119-134. Die Primärstructur der α- und β-Ketten der Hauptkomponenten der Hämoglobine des Straußes (Struthio camelus) und des Nandus (Rhea americana) (Struthioformes). Aspecte zur Atmungsphysiologie und Systematik.

(58) Thenius, E. (1979) Gustav Fischer Verlag (Uni-Taschenbücher; 865). Die Evolution der Säugetiere.

(59) Dayhoff, M.O. & Orcutt, B.C. (1982) NBR Report 820535-08710, Document Date. Protein Sequence Database, Version 5.

(60) Orcutt, B.C., Dayhoff, M.O. & Barker, W.C. (1982) NBR Report 820501-08710, Document Date. Alignment Score Program.

(61) Fermi, G. & Perutz, M.F. (1981) Clarendon Press, Oxford: Atlas of Molecular Structures in Biology, Vol 2. Haemoglobin and Myoglobin.

(62) Gauer/Kramer/Jung (1971) Urban & Schwarzenberg Munchen, Berlin, Wien: Physiologie des Menschen, Bd.5.

(63) Benesch, R. & Benesch, R.A. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 26, 162-167. The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin.

(64) Chanutin, A. & Curnish, R.R. (1967) Arch. Biochem. Biophys. 121, 96-102. Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes.

(65) Perella, M., Kilmartin, J.V., Fogg, J. & Rossi-Bernardi, L. (1975) Nature (London) 256, 759-761. Identification of the high and low affinity CO_2-binding sites of human haemoglobin.

(66) Tuchinda, S., Nagai, K. & Lehmann, H. (1975) FEBS Lett. 49, 390-391. Oxigen dissociation curve of haemoglobin Portland.

(67) Perutz, M.F. & Brunori, M. (1982) Nature (London) 299, 421-426. Stereochemistry of cooperative effects in fisch and amphibian haemoglobins.

(68) Arnone, A. & Perutz, M.F. (1974) Nature (London) 249, 34-36. Structure of inositol hexaphosphate - human desoxyhaemoglobin complex.

(69) Haeckel, E. (1866): Generelle Morphologie der Organismen. Berlin (G. Reimer).

Lebenslauf

1.) Angaben zur Person

Name	Bieber, Franz Adam
Geburtsdatum	15.10.1949 in Goldbach bei Aschaffenburg
Staatsangehörigkeit	deutsch

2.) Schulbildung

1956-1961 Volksschule in Goldbach
1961-1963 Oberrealschule der Stadt Aschaffenburg
1963-1970 Heimschule St. Landolin in Ettenheim
(Abitur)

3.) Bundeswehr

1970-1972

4.) Studium

WS 1972/73 Beginn des Biochemiestudiums an der Universität zu Tübingen
Frühjahr 74 Vordiplom 1. Teil
Frühjahr 76 Vordiplom 2. Teil
Frühjahr 79 mundliche Diplomhauptprüfung mit den Hautfächern Biochemie und Organischer Chemie und Mikrobiologie als Nebenfach

Oktober 79 bis August 80 Diplomarbeit bei Herrn Prof.Dr. H. Probst mit dem Thema: Fragmentierung von Chromatin in Kernen von Ehrlich Ascites Tumorzellen durch die Restriktions Endonuclease EndoR EcoRI.

Dezember 80 bis Januar 83 Doktorarbeit am Max Planck Institut für Biochemie in Martinsried bei München unter der Leitung von Herrn Prof.Dr. G. Braunitzer aus Martinsried und Herrn Prof.Dr. H. Probst aus Tübingen.

Meine akademischen Lehrer waren

in der Physik: Prof.Dr. F. Gönnenwein, Prof.Dr. M. Baumann;

in der Zoologie: Prof.Dr. F.P. Möhres, Prof.Dr. K.G. Grell;

in der Botanik: Prof.Dr. B. Schwemmle;

in der Anatomie: Prof.Dr. K. Mörike;

in der Anorganischen Chemie: Prof.Dr. W. Rüdorff, Prof.Dr. D. Krug;

in der Organische Chemie: Prof.Dr. E. Muller, Prof.Dr. W. Voelter, Prof.Dr. H. Hagenmaier, Prof.Dr. G. Jung, Prof.Dr. E. Bayer;

in der Physikalischen Chemie: Prof.Dr. H. Mauser, Prof.Dr. W. Zeil, Prof.Dr. H. Oberhammer, Prof.Dr. W. Braun;

in der Physiologie: Prof.Dr. E. Betz, Prof.Dr. R. Jacob;

in der Pflanzenphysiologie: Prof.Dr. H. Metzner, Prof.Dr. H. Ninnemann, Dr. K. Wegemann;

in der Pharmakologie: Prof.Dr.med. M. Siess;

in der Mikrobiologie: Prof.Dr. V. Braun, Prof.Dr. H. Zahner;

und in der Biochemie: Prof.Dr.Dr. G. Weitzel, Prof.Dr. D. Mecke, Prof.Dr. G. Braunitzer, Prof.Dr. H. Probst, Prof.Dr. A. Wendel, Prof.Dr. U. Weber, Prof.Dr. U. Weser, Prof.Dr. J. Guglielmi, Dr. H. Bisswanger. Dr. S. Hörnle.